



UNIVERSIDAD DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tesis Doctoral

*Identificación y caracterización
de las células madre de la hipófisis*

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Montserrat García Lavandeira

Santiago de Compostela, 2012

La Dra. Clara Álvarez Villamarín, Profesora titular y el Dr. Carlos Diéguez González, Catedrático, ambos del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela

Autorizan:

A la licenciada Dña. **Montserrat García Lavandeira** a la presentación del trabajo titulado “**Identificación y caracterización de las células madre de la hipófisis**”, que ha realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela, para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste, firmamos la presente autorización en Santiago de Compostela, a día 31 de Enero de 2012.

Dña. Clara Álvarez Villamarín

D. Carlos Diéguez González

AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar a Carlos Diéguez y a Clara Álvarez, mis directores de tesis, la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación y haber dirigido mis pasos en la realización de este trabajo ofreciéndome su apoyo y sus conocimientos.

Clara, gracias por haberme prestado tu apoyo tanto en momentos profesionales como personales y por haber invertido tu tiempo en dirigir mis pasos en el mundo de la ciencia, dándome la oportunidad de equivocarme y corregir mis errores. Sin tu confianza no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Gracias a mis compañeras de laboratorio, Susana, María, Sihara y Esther, así como a las nuevas incorporaciones Joana, Ángela y Tania por los momentos compartidos tanto fuera como en el laboratorio. También quiero agradecer a Sulay y a Marta su ayuda con los animales, así como a Ana Senra su colaboración en la realización de las inmunohistoquímicas. Agradecer las horas pasadas con toda la gente que está o ha pasado por el departamento, en especial a Noela, Carmen Gil, Marga y Carmen.

Gracias a Miguel Japón y Carmen Sáez porque sin su colaboración no sería posible realizar los experimentos en hipófisis humana. También quiero agradecer a Marcos Malumbres y María Blasco su colaboración en los experimentos realizados en ratón.

Gracias a mis amigas, de fuera del laboratorio, con las que también he compartido momentos durante estos años. A Patri por su amistad, por nuestras horas de café y todos los momentos compartidos desde que nos conocimos. A Montse por sus e-mails y seguir manteniendo la amistad a pesar de la distancia.

Gracias a mi familia, a mi padre y a mi madre, porque me habéis dado la oportunidad de una inmejorable educación y por estar a mi lado siempre que os necesito. A mi hermano Juan, por todo su apoyo “logístico” y estar siempre disponible cuando me hace falta. A mi hermana Ana, por todo su cariño y estar siempre dispuesta a ayudarme.

Y desde luego, a los dos grandes amores de mi vida. A mi marido José Manuel, por llegar a mi vida y quedarte en ella. Por apoyarme durante todas las horas que he invertido en la realización de este trabajo y hacerme sentir feliz y afortunada de tenerte a mi lado. A mi hijo Isaac, porque es mi tesoro y la personita que llena con sus besos y abrazos todos los rincones de mi corazón.

En definitiva, gracias a todos los que de un modo u otro han contribuido a la realización de esta tesis.

Índice

ABREVIATURAS	I
1.-INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- LA HIPÓFISIS	1
1.2.- LA FAMILIA RET/GDNF Y SUS LIGANDOS	9
1.2.1.- EL RECEPTOR RET	10
A) ESTRUCTURA	11
B) ISOFORMAS	12
C) EXPRESIÓN DE RET IN VIVO	14
D) COMPLEJO RECEPTOR GFRa/RET	16
1.2.2.- RECEPTORES GRFa (GDNF-FAMILY RECEPTOR ALPHA)	18
1.2.2.1.- EL RECEPTOR GRFa2	20
A) ESTRUCTURA	20
B) EXPRESIÓN	21
1.2.3.- LIGANDOS PERTENECIENTES A LA FAMILIA GDNF (GFL)	22
1.2.3.1.- NEURTURINA: LIGANDO ESPECÍFICO DE GFRa2	25
A) DESCUBRIMIENTO	25
B) ESTRUCTURA	26
C) DISTRIBUCIÓN Y ACCIONES BIOLÓGICA	26
1.3.- EL SISTEMA GFRa/RET EN LA HIPÓFISIS	29
1.4.- CONTROL PARACRINO DE LA ADENOHIPÓFISIS.....	31
1.5.- CÉLULAS MADRE	36
1.5.1.- CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE.....	37
1.5.2.- CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS MADRE TRONCALES O “STEM CELLS”	40
1.5.3.- MOLÉCULAS ASOCIADAS A LA AUTO-RENOVACIÓN	43
1.5.4.- DIFERENCIACIÓN ESPONTÁNEA IN VITRO	44
1.5.5.-MARCADORES CARCTERÍSTICOS DE ESTADO INDIFERNCIADO	45
1.5.6.- NICHOS DE LAS CÉLULAS MADRE	46
1.5.7.- PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS.....	49
1.5.8.- CÉLULAS MADRE EN LA HIPÓFISIS.....	53
2.- OBJETIVOS	61
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	65
3.1.- ANIMALES	65
3.2.- INMUNOFUORESCENCIA EN TEJIDO.....	66
A) Congelación de la hipófisis de rata	66
B) Procesamiento e la muestra	67

C) Fijación de la muestra.....	67
D) Incubación con anticuerpos	70
E) Análisis de resultados	71
3.3.- TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA	74
A) Recuento de células inmunoteñidas en secciones de parafina	74
3.4.- WESTERN BLOT	75
A) Extracción de la proteína	75
B) Cuantificación de proteína.....	76
C) Electroforesis.....	76
D) Transferencia.....	78
E) Inmunodetección	80
D) Stripping.....	82
3.5.- FISH CUANTITATIVA CONFOCAL DE TELÓMEROS (TELOMAPEO).....	83
3.6.- TÉCNICA DE RETENCIÓN DE BrdU EN TEJIDO	85
3.7.- TÉCNICA qRT-PCR EN TEJIDO	86
A) Extracción de mRNA	86
B) Real-Time PCR en tejido.....	87
B.1.- RT-PCR (PCR Reverso Transcritasa).....	87
B.2.- RT-PCR (Real Time PCR) y análisis del DNA	88
3.8.- AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS GFra2 POSITIVAS	90
3.9.- TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA ESFEROIDES.....	93
3.10.- CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LOS ESFEROIDES MEDIANTE BrdU	95
3.11.- DIFERENCIACIÓN DE ESFEROIDES.....	97
3.12.- TÉCNICA PCR EN CÉLULAS AISLADAS Y DIFERENCIADAS	100
A) Extracción de mRNA	100
B) PCR	101
3.13.- AMPLIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS GPS COMO CÉLULAS MADRE	102
4.- RESULTADOS.....	105
4.1.- LA EXPRESIÓN DE GFra2 ESTÁ RESTRINGIDA PRINCIPALMENTE A LA ZONA MARGINAL DE LA HIPÓFISIS	105
4.2.- LAS CÉLULAS GFra2+ EN ROEDORES Y HUMANOS EXPRESAN FACTORES ESPECÍFICOS DE LA HIPÓFISIS Y MARCADORES DE CÉLULAS MADRE	117
4.3.- PURIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS GFra2+	128
4.4.- LOS ESFEROIDES GFra2+ SON CAPACES DE DIFERENCIARSE EN CÉLULAS PRODUCTORAS DE HORMONAS.....	136
4.5.- CRECIMIENTO DE GPS COMO CÉLULAS MADRE. AMPLIFICACIÓN	141
4.6.- LA IMPORTANCIA DEL NICHOS DE CÉLULAS GPS EN LA FISIOLÓGIA DE LA HIPÓFISIS IN VIVO	145
5.- DISCUSIÓN.....	159
5.1.- EL NICHOS DE CÉLULAS MADRE EN TESTÍCULO.....	162
5.2.- EL PAPEL DE RET Y SU CO-RECEPTOR GFra2 EN LA HIPÓFISIS	165

5.3.- EL NICHOS DE CÉLULAS GPS (GFRA2+/PROP+/STEM CELL+ (SOX2, SOX9, OCT4) EN LA HIPÓFISIS.....	169
5.3.1.- Células propuestas como candidatas a células madre de la hipófisis.....	169
5.3.2.- Las células GPS (GFRA2+/PROP+/STEM CELL+ (SOX2, SOX9, OCT4) forman un nicho de células madre en la hipófisis en rata, ratón y humano.....	173
5.3.3.- Capacidad de las células GPS para formar esferoides y diferenciarse <i>in vitro</i>	176
5.4.- NESTIN Y EL NICHOS GPS EN LA HIPÓFISIS.....	180
5.5.- PROP-1 Y b-CATENINA EN LA HIPÓFISIS.....	182
5.6.- ESTUDIO DE LAS CÉLULAS GPS EN UN MODELO DE HIPOFISITARISMO.....	186
5.7.- LAS CÉLULAS GPS: ¿CÉLULAS MADRE Ó PROGENITORAS?.....	189
6.- CONCLUSIONES.....	195
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	199
8.- ANEXOS.....	213
Anexo I: Publicaciones	
Anexo II: Patente	

ABREVIATURAS

ACE: Encima convertidora de angiotensina.

ACTH: Adrenocorticotropina.

ADH: Vasopresina.

AMCA: *beta-Ala-Lys-N-epsilon-AMCA*

AP: adenohipófisis.

ASCs: células madre adultas

b-cat: b-Catenina.

BrdU: Bromo deoxiridina

CPHD: Deficiencia Combinada de Hormonas Hipofisarias

CRF: Craneofaringiomas.

Ctnnb1^{-/-}: Ratón deficiente en b-catenina.

CytoK: Citoqueratina.

DifM: Medio de diferenciación.

E-cad: E-cadherina

EMT: Células epitelio-mesenquimales de transición.

ES: *Embrionyc Stem Cells*.

ESC: Embrionyc Stem Cells.

ESGRO: LIF (*Leukemia inhibitory factor*).

FBS: Suero fetal bovino.

FS: células folículo esteladas

FSC: Células foliculoesteladas

FSH: Hormona estimulante del folículo.

GH: Hormona de crecimiento.

GH4C1: Línea celular de células somatotropas.

GPS: GFRa2+/PROP+/stem cell+ (SOX2, SOX9, OCT4)

IL: Lóbulo intermedio.

LH: hormona luteinizante.

MEF: Fibroblastos embrionarios de ratón.

MEFM: Medio condicionado de MEF.

MSC: Células madre mesenquimales.

MSH: Melanocitos.

MZ: Zona marginal.

N2 y B27: Suplementos para el cultivo de células madre.

NF: Neurofilamento.

NP: Neurohipófisis.

NSC: Neural stem cells.

NTN: Neurturina.

OIA: *Oncogene induced apoptosis*

OT: Oxitocina.

PCFCs: células formadoras de colonias

Pit-1: Pituitary-specific transcription factor-1

POMC: Proopiomelanocortina.

PRL: Prolactina

SP: *side-population*.

SPCs: Células espermatogonias progenitoras.

SpherM: Medio de Esferoides.

SSC: células madre espermatogonias

StemM: Medio de células madre.

TCF/LEF: Familia de factores de transcripción de la vía de Wnt.

TSH: Hormona estimulante de la tiroides o tirotropina.

Vim.: Vimentina.

Wnt: Vía de señalización de Wint.

1.- Introducción

1.- INTRODUCCIÓN

Los organismos animales están dotados de numerosos receptores sensoriales capaces de percibir e informar de las condiciones internas y externas. Esta información viaja hasta el sistema nervioso central generándose distintas respuestas, motoras, autónomas y neuroendocrinas. El sistema efector para la respuesta endocrina lo constituye fundamentalmente, el eje hipotálamo-hipofisario. De este modo, las neuronas hipotalámicas reciben la información de otras áreas del sistema nervioso central, así como de los niveles circulantes de hormonas esteroideas, tiroideas y peptídicas. Dependiendo de esta información liberan hormonas al sistema portal hipotálamo-hipofisario controlando la secreción de hormonas adenohipofisarias.

1.1- LA HIPÓFISIS

La hipófisis es una glándula endocrina que regula la mayor parte de los procesos biológicos del organismo. Regula las funciones fisiológicas básicas tales como el crecimiento, la respuesta al estrés, la reproducción, la lactancia y la homeostasis metabólica no solo mediante la liberación de hormonas, sino también mediante el control de la cantidad de número de células productoras de cada hormona.

Se localiza en la silla turca del hueso esfenoides y conecta con el hipotálamo, con el que guarda importantes relaciones anatómicas y funcionales, a través del tallo hipofisario, a nivel de la eminencia media.

Existen pequeñas diferencias anatómicas, al comparar las hipófisis humanas con la hipófisis de roedores, en cuanto a la situación de la adenohipófisis y la neurohipófisis. Así, en el ser humano la adenohipófisis es anterior y la neurohipófisis es posterior, sin embargo en roedores la neurohipófisis es superior mientras que la adenohipófisis hace una forma de “C” por debajo de la neurohipófisis que se abre en la parte anterior donde solo aparece neurohipófisis (fig.1).

Otra de las diferencias ente roedores y humanos es la existencia del lóbulo intermedio, mientras que en roedores también hay crecimiento de las células que forman el lóbulo intermedio en humanos la conexión entre la neurohipófisis y la adenohipófisis es muy delgada y está formada por tejido conjuntivo (fig.1)

En cuanto a la cavidad residual de la bolsa de Rathke, recubierta por células epiteliales, llamada zona marginal (MZ), también existen diferencias entre roedores y humanos. En roedores es más o menos continua, mientras que en los seres humanos las células epiteliales se rodean de tejido conjuntivo del lóbulo intermedio por lo que esta zona se denomina quistes de Rathke de la zona marginal (fig. 1).

Desde el punto de vista embriológico, morfológico, estructural y funcional se distinguen en la hipófisis de rata tres partes bien diferenciadas (fig. 2).

- la neurohipófisis o porción nerviosa (NP).
- la adenohipófisis o porción epitelial (AP).
- el lóbulo intermedio (pars intermedia) (IL).

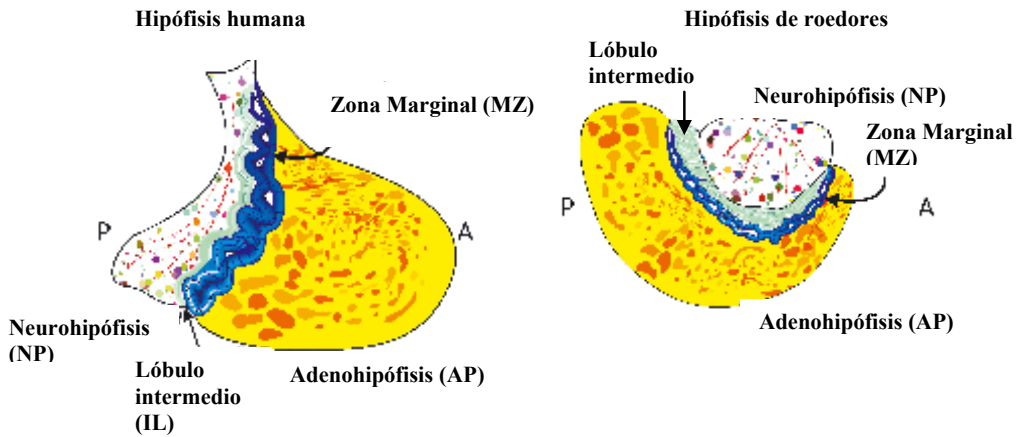


Fig. 1.- **Comparación entre la hipófisis humana y la de roedores en un eje similar sagital medial.** En humanos la adenohipófisis (AP) es anterior y la neurohipófisis (NP) es posterior. Hay una zona intermedia de menor importancia (IL) con tejido conjuntivo. En roedores (rata, ratón) la NP es superior, mientras que la AP está hacia atrás formando una “C” que rodea completamente la NP. En el centro hay una zona bien definida el IL con las células epiteliales productoras de POMC. Tanto en humanos como en roedores entre AP e IL esta la zona marginal, formada por una capa de células epiteliales que rodean una pequeña cavidad, que en humanos se distribuye en quistes y en roedores es más o menos continua.

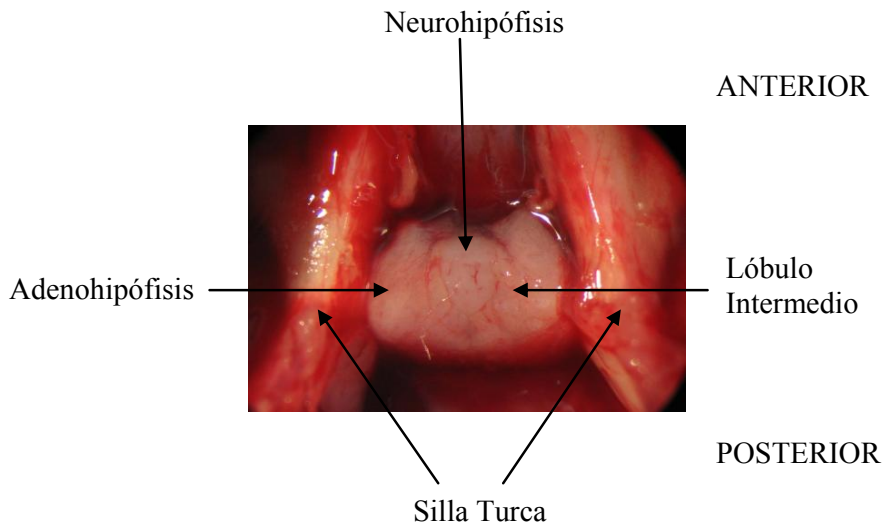


Fig. 2.- **Anatomía y localización de la Hipófisis de rata.** La hipófisis está protegida por el hueso esfenoides o silla turca y recubierta por la dura madre. En roedores se distinguen tres partes bien diferenciadas anatómicamente y funcionalmente, la adenohipófisis, la neurohipófisis y el lóbulo intermedio.

La **Neurohipófisis o hipófisis posterior** (fig. 3) tiene un origen embriológico diferente al del resto de la hipófisis, ya que deriva de una evaginación del suelo del diencéfalo que se desarrolla en dirección caudal, sin perder el contacto con el encéfalo, por lo que tiene funciones diferentes. Se suele dividir a su vez en tres partes: eminencia media, tallo infundibular y pars nervosa, de las cuales la última es la más funcional. Las células de la neurohipófisis no son células endocrinas y se conocen como pituicitos que son células gliales de sostén. Por tanto, la neurohipófisis no es en realidad una glándula secretora ya que se limita a almacenar los productos de secreción del hipotálamo. Los somas neuronales de las neuronas de los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular secretan la *ADH (vasopresina)* y la *(OT) oxitocina* respectivamente, que se almacenan en las vesículas de los axones que de él llegan a la neurohipófisis; dichas vesículas se liberan cerca del plexo primario hipofisario en respuesta a pulsos eléctricos por parte del hipotálamo.

- La *ADH (vasopresina)*, produce vasoconstricción generalizada a nivel cardiovascular, actúa sobre el riñón disminuyendo la diuresis, aumenta la glucólisis en el hígado y estimula la liberación de ACTH.
- La *Oxitocina (OT)*, produce la contracción de las células mioepiteliales, en la glándula mamaria, promoviendo la contracción de las fibras musculares lisas y con ello la expulsión de leche; en el útero, provoca la expulsión del feto. Además aumenta la liberación de PRL y controla la regresión de cuerpo lúteo. En el tracto genital de los machos, promueve contracciones musculares y disminuye la síntesis de testosterona, aunque su importancia a nivel fisiológico es limitada.

La **Adenohipófisis o hipófisis anterior** (fig. 3) se forma a partir de una evaginación del ectodermo bucal que crece en dirección craneal, dando lugar a la bolsa de Rathke. Esta evaginación crece y migra hasta ponerse en contacto con el tallo infundibular, de manera que rodeará parcialmente a la neurohipófisis. Finalmente una constricción en su base la separa de la cavidad bucal. Al mismo tiempo, disminuye el tamaño de la luz de la bolsa de Rathke que queda reducida a una pequeña hendidura.

La adenohipófisis se organiza en grupos de células endocrinas de epitelio polarizado llamadas acinos, rodeados por una membrana basal. Las células secretoras se anclan por su polo basal a la membrana basal. En el tejido conectivo unos pocos fibroblastos y unos pocos capilares dirigen las secreciones de hormonas a través del torrente sanguíneo hacia el órgano diana. En la parte superior de la adenohipófisis una red de capilares procedentes de la parte inferior del hipotálamo forma el sistema hipotálamo-hipofisario a través del cual los péptidos producidos por las neuronas del hipotálamo alcanzan rápidamente la adenohipófisis de forma lo suficientemente concentrada como para ejercer una acción reguladora y trófica importante en las células endocrinas.

La adenohipófisis alberga cinco tipos de células endocrinas secretoras de hormonas que regulan la función de otros órganos y glándulas endocrinas a lo largo de la vida mediante la secreción de seis hormonas:

- La mayoría son células **Somatotropas** (45%). Producen *hormona del crecimiento (GH)* su acción se desarrolla directamente sobre los tejidos del organismo y no a través de la mediación de otras glándulas, como sucede con las otras hormonas. Se denomina “hormona de

crecimiento “ya que induce y regula el crecimiento corporal. Estimula el hígado para producir IGF1 (insulinalike growth factor-1), que a su vez provoca el crecimiento de músculos y huesos. Estimula la diferenciación de células adiposas musculares y cartilagosas. Favorece la gluconeogénesis y favorece la retención de sodio, potasio y calcio (calcio sólo durante el crecimiento). Además de sus acciones a nivel metabólico, la hormona juega un importantísimo papel como factor de supervivencia celular.

- Las **Corticotropas** (10%) producen *corticotropina* o *adrenocorticotropina (ACTH)* estimula la secreción de hormonas glucocorticoides (cortisol) y mineralocorticoides (aldosterona) por las glándulas suprarrenales. El cortisol, regula el metabolismo de la glucosa, proteínas y grasas y la homeostasis del agua y las sales. La aldosterona actúa en la conservación del sodio, secretando potasio, e incrementando la presión sanguínea.
- Las células **Tirotropas** (10%) sintetizan la *hormona estimulante de la tiroides (TSH)* o *tirotropina* cuya función reside en controlar la producción y secreción de hormonas tiroideas, la tiroxina o T4 y la triyodotironina o T3, por la tiroides.
- Las **Lactotropas** (25%) producen *prolactina (PRL)* que estimula el desarrollo de la glándula mamaria durante el embarazo y la producción de leche tras el parto.
- Las **Gonadotropas** (<10%) que producen gonadotropinas como la *hormona luteinizante (LH)* y la *hormona estimulante del folículo*

(*FSH*) que controlan el desarrollo y crecimiento de las gónadas y la producción de hormonas sexuales, así como sus actividades reproductoras. En la mujer, la hormona LH es la responsable de que se inicie la ovulación y la hormona FSH estimula el crecimiento del folículo ovárico que contiene los óvulos siendo su concentración máxima en la primera parte del ciclo menstrual, durante las primeras etapas de desarrollo del folículo. En el varón, tanto la FSH como la LH son esenciales para la espermatogénesis (formación de espermatozoides).

El **Lóbulo Intermedio o pars intermedia**, casi no existe en el hombre pero en roedores tiene una gran importancia funcional. Es una región localizada entre la neurohipófisis y la adenohipófisis, separada de esta última por la hendidura restante de la cavidad de la bolsa de Rathke. En el lóbulo intermedio, se localizan las células que principalmente sintetizan los derivados de la proopiomelanocortina (POMC) por ejemplo la *hormona estimulante de melanocitos (MSH)*.

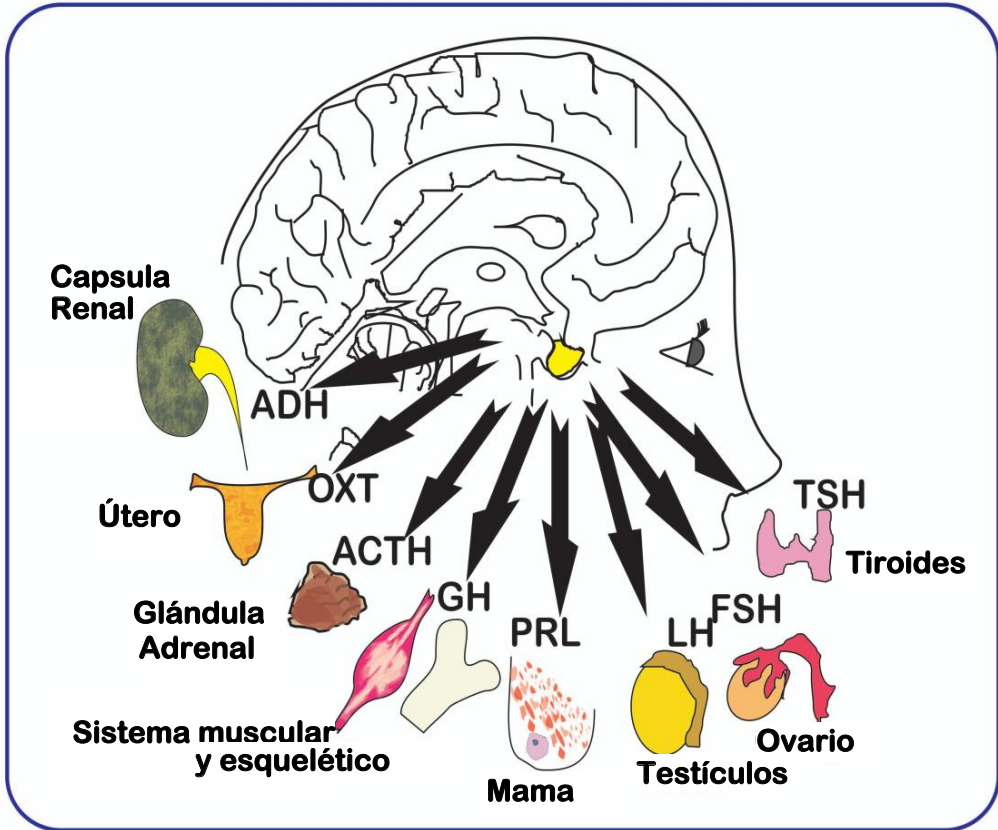


Fig. 3.- La hipófisis produce hormonas que actúan por todo el cuerpo. La adenohipófisis produce TSH, actúa en la tiroides manteniendo la producción de hormonas tiroideas, FSH y LH, mantienen la función reproductiva y la secreción de esteroides por las gónadas, PRL, mantiene la síntesis de leche en la glándula mamaria, GH, induce el crecimiento y mantiene el tropismo de los huesos y los músculos esqueléticos y el corazón y ACTH, produce glucocorticoides y mineralocorticoides por las glándulas suprarrenales. La neurohipófisis, libera oxitocina, actúa en el miometrio en el parto y ADH, actúa en el riñón y el sistema vascular para mantener la osmolaridad y el volumen sanguíneo.

1.2.- LA FAMILIA RET/GDNF Y SUS LIGANDOS

La hipófisis es una glándula endocrina en la que células especializadas secretan hormonas que actúan sobre el resto del organismo en la vida cotidiana y también para adaptarse a la pubertad, el embarazo o el hipotiroidismo. La hipófisis regula específicamente cada uno de los tipos celulares productores de hormonas, no solo mediante la liberación de hormonas, sino también mediante el control de la cantidad de células.

Hace algunos años, las mutaciones en RET o GDNF fueron excluidas como causa de los adenomas hipofisarios (Yoshimoto et al., 1999). En ese momento, sin embargo, no había ningún estudio de la expresión de estos genes en la hipófisis normal. Nuestro grupo describió por primera vez, los patrones de expresión de RET, GRFa1 y GDNF en la hipófisis en ratas, tanto a nivel de ARNm como de proteína (Urbano et al., 2000). Mediante doble inmunofluorescencia, se observó que las únicas células de la adenohipófisis que expresaban los receptores GFRa1/RET eran las Somatotropas, mientras que los restantes tipos de células secretoras de la adenohipófisis eran negativas (Urbano et al., 2000). Estudios similares realizados en la hipófisis humana mostraron los mismos resultados. El sistema GDNF/GRFa1/RET se expresaba en la adenohipófisis y otra vez en las células Somatotropas (Japon et al., 2002). Para estudiar la función de RET en somatotropas, nuestro grupo comenzó con un sistema más simple que la de todo el órgano. Algunas líneas celulares hipofisarias de rata mantienen la capacidad de síntesis y secreción de hormonas, aunque han perdido parte importante de receptores para factores hipotalámicos (Coya et al., 1999). Se utilizaron las línea GH4C1 que mantiene la capacidad de secreción de GH y receptores GHSR aunque no expresan receptores de GHRH, y además,

mientras que las células GH4C1 expresan GDNF y GRFa1 no expresan el receptor RET (Canibano et al., 2007). Aunque en la infección transitoria de las células GH4C1 se pudo detectar la expresión de RET, no hemos podido obtener una población estable de células GH4C1 que expresaran RET. A través de detallados estudios nuestro grupo fue capaz de demostrar una fuerte acción apoptótica de RET en la línea de células somatotropas GH4C1, la cual era bloqueada por el ligando GDNF, que inducía la supervivencia. La apoptosis era inducida por ambas isoformas RTEL y RETS, mientras que GDNF inhibía la muerte celular en presencia de cualquier receptor (Canibano et al., 2007).

1.2.1- EL RECEPTOR RET

RET es un receptor transmembrana que pertenece a la super-familia de receptores tirosinaquinasa los cuales juegan un papel muy importante en la comunicación intracelular. Todos estos receptores tienen una estructura muy similar, caracterizada por la presencia de un dominio de unión a ligando, extracelular, un segmento transmembrana y una región intracelular rica en dominios catalíticos, tirosinaquinasa. RET posee una secuencia N-terminal de naturaleza hidrofóbica que constituye la señal de entrada al retículo endoplasmático. Un dominio extracelular rico en cisteínas, una región transmembrana y un dominio citoplasmático (C-terminal) con dos regiones tirosinaquinasa separadas por 20 aminoácidos (Iwamoto et al., 1993).

Inicialmente fue descubierto como un proto-oncogén tras transfectar, en células NIH 3T3, DNA de un linfoma de células T humano (Takahashi et al., 1985). Posteriormente se detecta RET como un gen endógeno, fuertemente

expresado en el sistema nervioso central (SNC), los órganos linfáticos y los testículos (Tahira et al., 1990; Takahashi and Cooper, 1987).

En humanos el gen de RET, está localizado en el cromosoma 10 (10Q11.2) (Takahashi et al., 1985). En rata se localiza en el cromosoma 4 (4q42) y presenta características morfológicas muy equivalentes al de humanos, ya que RET es una proteína altamente conservada. El estudio de la secuencia de RET fue posible a través de clonaciones, donde establecieron la existencia de 20 exones, tras realizar un detallado mapa con el uso de enzimas de restricción (Pasini et al., 1995).

A) ESTRUCTURA

Se trata de una proteína transmembrana de la familia de las tirosinaquinasas que en este sistema funciona como la subunidad transductora de señal. Está normalmente inactiva y posee dos dominios separados por un segmento transmembrana:

- Dominio extracelular (fig. 4): contiene una región rica en cisteínas y un dominio homólogo a la región de unión intermolecular de la familia de las cadherinas (moléculas de adhesión entre las células). Sin embargo estos dominios no parecen estar implicados en esta función de adhesión (Robertson and Mason, 1997), sino que dan soporte al receptor y facilitan la interacción entre RET y el receptor GFRA, cuando este último se une al ligando (Nozaki et al., 1998). En uno de estos dominios similares a las cadherinas presenta un lugar de unión al calcio, necesario para su activación (Nozaki et al., 1998).

- Dominio intracelular (fig. 4): incluye una región tirosinkinasa normalmente inactiva y una cola C-terminal con 18 tirosinas autofosforilables, de las que 2 se encuentran cerca del dominio cercano a la membrana, 11 en el dominio kinasa y 5 en la cola carboxiterminal. De todas estas tirosinas algunas tienen mayor relevancia que otras, son de importancia para la célula la tirosina 905, la 1015, la 1062 y la 1096. La dimerización de RET se produce cuando el complejo GFRA-GFL se une a su dominio extracelular, de manera que sus dominios tirosinkinasa se activan. La fosforilación de los residuos tirosina de uno de los receptores RET permite la fosforilación de residuos tirosina del otro receptor RET con el que homodimerizó, provocando así una unión más fuerte entre ambos receptores.

B) ISOFORMAS

Se ha descrito una región crítica en el extremo 3' correspondiente al exón 19 donde se produce el procesamiento alternativo (splicing alternativo) del gen de RET que da lugar a las tres isoforma de RET. Estas isoformas presentan una secuencia latamente conservada, así como la existencia de múltiples señales de poliadenilación, por debajo del exón 19, lo que sugiere una importancia vital desde el punto de vista funcional (Gartner et al., 2005). Estas isoformas de RET son diferentes a la hora de inducir transformación celular y diferenciación y estas diferencias a nivel funcional son el reflejo directo de su longitud, la presencia o ausencia de determinadas tirosinas así como la afinidad que estas posean por determinados adaptadores proteicos, desencadenando activación de diferentes vías intracelulares (Tsui-Pierchala et al., 2002). Sin embargo también presentan similitudes como por ejemplo la tirosina en posición 1062, que es clave para la

activación de cascadas intracelulares; u otras tirosinas como la 761, 826, 900, 981 y la 1015. Estas tres isoformas de RET son:

- *RET9 o isoforma corta de RET* (fig. 4): está formada por 1072 aminoácidos, de los cuales 9 forman el extremo C-terminal implicado en la transducción diferencial de la señal (Tahira et al., 1990). En esta cola citoplasmática existen 16 tirosinas de las que cabe destacar la Tyr 905 (que tiene afinidad por la proteína adaptadora GRB10), la Tyr 1015 (afinidad de unión a PLC γ) y la Tyr 1062 que se puede unir a diversas proteínas adaptadoras como SHC, SNT (FRS2) o ENIGMA.
- *RET51 o isoforma larga* (fig. 4): constituida por 1114 aminoácidos. Su extremo C-terminal es el más largo, 51 aminoácidos. Posee 19 tirosinas, entre las que destacamos Tyr 905, 1015, 1062 y la tirosina 1096, que no está presente en la isoforma corta. La tirosina 1096 tiene afinidad por la proteína adaptadora GRB2 que al unirse a GAB2 activa la vía PI3K/Akt (Tahira et al., 1990).
- *RET43 o isoforma intermedia de RET* (fig. 4) (Matera et al., 2000): tiene una longitud total de 1106 aminoácidos, su extremo C-terminal está formado por 43 aminoácidos en los que existen 16 tirosinas. Contiene las cuatro tirosinas que mencionamos en la isoforma larga de RET, con la diferencia de que la tirosina 1096 presenta poca afinidad por Shc de manera que la vía de la PI3K es poco activa.

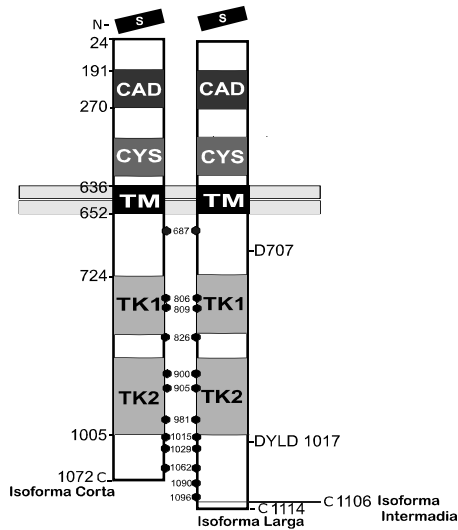


Fig. 4.- Estructura e isoformas del Receptor RET. Se distingue un dominio extracelular, con una región homólogo al dominio de las Cadherinas (CAD) y una región rica en Cisteínas (CYS), una región transmembrana (TM) y un dominio intracelular que contiene los dominios Tirosinkinasa (TK1 y TK2).

C) EXPRESIÓN DE RET IN VIVO

La expresión de RET, gracias a estudios realizados en embriones de roedores, se ha detectado principalmente en el desarrollo del sistema nervioso central y periférico, incluyendo las células de la cresta neural, los ganglios del cráneo, las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas, las motoneuronas de la médula espinal, ganglios de la raíz dorsal y neuroblastos entéricos, así como en el sistema excretor en los conductos nefríticos, yemas uretrales y los conductos colectores (Song et al., 2010b; Trupp et al., 1997; Tsuzuki et al., 1995). Estos estudios indican que la expresión de RET tiene un papel importante en el desarrollo y la diferenciación del sistema nervioso y los riñones.

El knockout para RET tiene un fenotipo realmente severo con profundas alteraciones en los riñones y el sistema reproductivo. Además, los animales mueren a las pocas horas de nacer debido a un fallo en el peristaltismo y la digestión, debido a la ausencia de inervación parasimpática en el intestino (Schuchardt et al., 1994). Estos datos indican que RET desempeña un papel crítico en la organogénesis neuronal y renal.

El estudio de RET ha cobrado gran importancia debido a que su expresión se detecta en diferentes tumores humanos neuroendocrinos esporádicos y hereditarios que tienen su origen en la cresta neural entre los que cabe destacar:

- Mutaciones de RET en la línea germinal están unidas a los *síndromes MEN2A* y *MEN2B* (Neoplasia Endocrina Múltiple de tipo 2A y 2B) y su subtipo, *FMTC (carcinoma medular de tiroides familiar)*. Se producen por mutaciones activantes de RET (PlazaMenacho et al., 2006).
- La enfermedad denominada HSCR (Enfermedad de Hirshsprung) caracterizada por la pérdida de inervación entérica en el intestino, puede producirse por mutaciones inactivantes de RET (Uesaka et al., 2008).
- La reordenación somática de RET resulta en la activación del receptor que está asociada con el carcinoma papilar de tiroides (Mitsutake et al., 2006).

D) COMPLEJO RECEPTOR GFRA/RET

El sistema de receptores utilizado por la familia de GDNF para mediar sus acciones biológicas es muy similar al observado en muchas citokinas, en el que un componente común denominado GFRA (GDNF-family receptor alpha) se une al ligando con alta afinidad proporcionando la especificidad, y hay otro receptor denominado RET (*rearranged during transfection*) que es utilizado por todos los ligandos. De una buena interacción entre ambos receptores se deduce el éxito en la transmisión del mensaje al interior de la célula (Santoro et al., 2004). Por tanto las actividades morfogenéticas y neurotróficas de estos ligandos están mediadas por este complejo receptor multicomponente formado por dos receptores con una división del trabajo bien delimitada:

- GFRA: unión específica a cada ligando
- RET: funciona como la subunidad transductora de señal.

Las señales de transducción se inician por la interacción proteína proteína entre ligandos, receptores y kinasas. En el caso del sistema RET/GFRA, en presencia de cualquiera de sus cuatro co-receptores extracelulares (GFRA 1-4) y sus respectivos ligandos (GDNF, NTN, ART y PSP), RET crossdimeriza y activa su actividad tirosinaquinasa (fig.5).

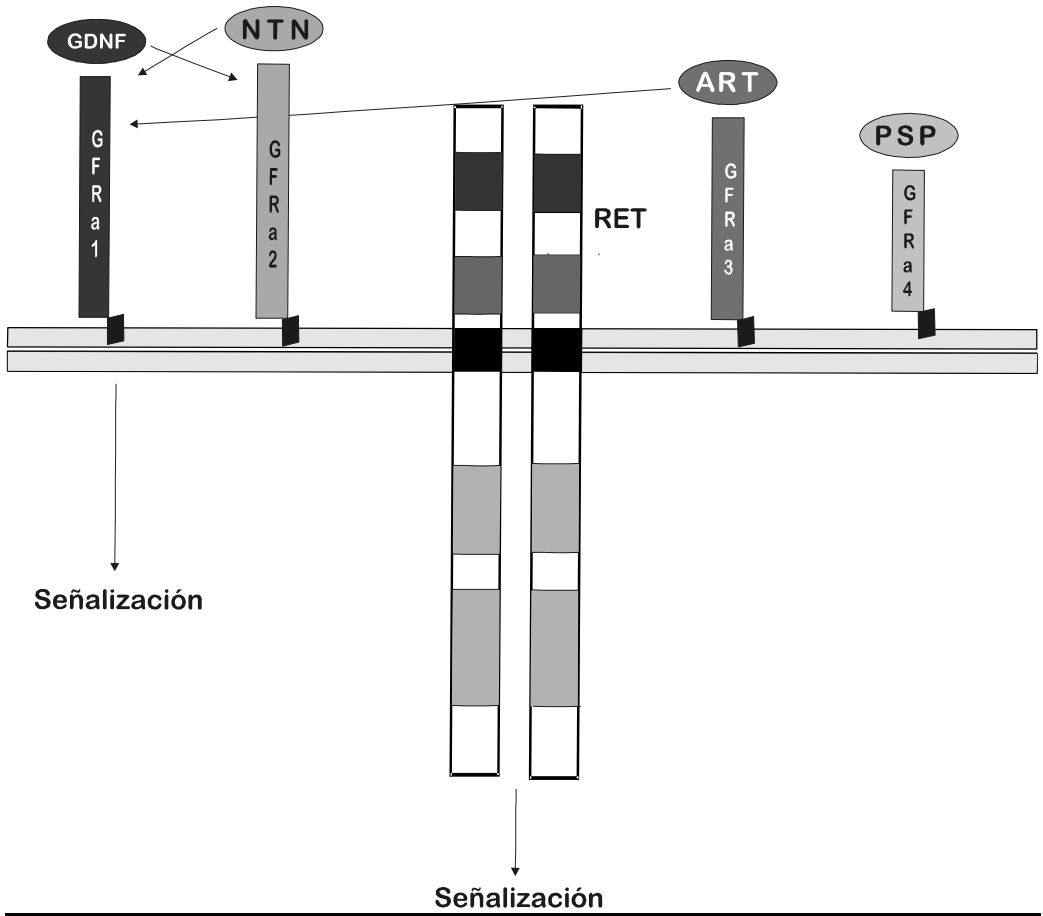


Fig. 5.- Modelos de interacción. Especificidades ligando-receptor.

1.2.2.- RECEPTORES GFRa (GDNF-FAMILY RECEPTOR alpha)

Los receptores GFRa (fig. 6) son una familia de proteínas no integrales de membrana ancladas extracelularmente por un GPI (glicosilfosfatidilinositol). Los miembros de esta familia de receptores comparten un 30-45% de homología y todos poseen el mismo patrón de cisteínas espaciadas a lo largo de la secuencia, lo cual hace sugerir una misma estructura secundaria (Airaksinen and Saarma, 2002) formada por 9 α -hélices y 2 láminas- β centrales a lo largo de aproximadamente 400 aminoácidos (Scott and Ibanez, 2001).

Sorprendentemente, distintos residuos hidrofóbicos y residuos cargados positivamente de la región central son necesarios para la unión al ligando, ya que se trata de la región más conservada (Scott and Ibanez, 2001).

Aunque son estructuralmente similares, cada receptor GFRa protagoniza interacciones específicas con diferentes miembros de la familia GDNF, aunque puede haber cierta actividad atenuada entre los diferentes ligandos y receptores. Su función es la unión específica a cada ligando. En el siguiente esquema se resaltan en **negrita** los receptores con preferencia de unión y en *cursiva* los secundarios.

-GFRa1 (<i>GFRa2 / GFRa3</i>)	→ GDNF
-GFRa2 (<i>GFR-1 /GFRa3</i>)	→ Neurturina (NTN)
-GFRa3 (<i>GFRa1</i>)	→ Artemina (ART)
-GFRa4	→ Persefina (PSP)

Así por ejemplo, GFRa1 funciona como el adaptador principal para el ligando GDNF, GFRa2 para Neurturina, GFRa3 para Artemina y GFRa4 para Persefina (Airaksinen and Saarma, 2002).

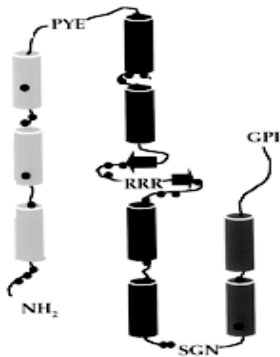


Fig. 6.- **Receptor GRFa.** Los puntos indican la localización de los residuos cisteína. Las α -hélices están representadas como cilindros, siendo los cilindros oscuros los implicados en la unión al ligando.

Los miembros de la familia GFRa tienen un patrón de expresión diferente, aunque muy solapado. Este patrón de expresión puede atender a regulación por factores tejido específicos o estar regulado por el desarrollo. Todos se expresan, en el sistema nervioso central y periférico (Quartu et al., 2007), además de en otros tipos de tejidos como testículo, ovario, riñón, etc. Sin embargo, la observación de que ratones que carecen receptor GFRa1, GFRa2, GFRa3 o GFRa4 posean fenotipos distintos indica que existen requerimientos únicos de cada miembro de la familia GFRa en los distintos procesos del desarrollo en los que esté implicada la activación de RET (Arighi et al., 2005).

1.2.2.1.- EL RECEPTOR GFRA2

GFRA2 es una glicoproteína de membrana anclada extracelularmente por un enlace GPI (glicosilfosfatidilinositol) que funciona como un receptor específico de NTN, tal como se ha demostrado in vivo, al observarse un fenotipo casi idéntico en ratones deficientes o en NTN o en GFRA2 (Heuckeroth et al., 1999; Rossi et al., 1999).

Se descubrió gracias a los estudios de homología con el receptor GFRA1 (Jing et al., 1996; Klein et al., 1997; Suvanto et al., 1997). Posteriormente se pudo comprobar que demostraba unas 30 veces más sensibilidad por Neurturina que por GDNF. Experimentos de unión in vitro con las formas solubles de los receptores RET, GFRA1 y GFRA2 muestran que GFRA2 une GDNF con alta afinidad sólo en presencia de RET (Klein et al., 1997; Sanicola et al., 1997), mientras que en células la interacción específica entre GDNF y GFRA2 también se veía en ausencia de RET (Trupp et al., 1998). Esta especificidad cruzada está demostrada por: (Jing et al., 1996; Suvanto et al., 1997) y otros autores.

A) ESTRUCTURA

En humanos GFRA2 está localizado en el cromosoma 8, región p21-p22 (Masure et al., 1998). En ratones nos encontramos con la localización del gen en el cromosoma 14D3-E1 que se corresponde con el mismo locus humano (Suvanto et al., 1997). La secuencia completa de este receptor está codificada por nueve exones diferentes. Su mRNA sufre procesamiento alternativo (*splicing alternative*), dando lugar a tres isoformas GFRA2a, GFRA2b y GFRA2c (Yoong and Too, 2007). Estas isoformas son idénticas en ratón y humano. En rata estas

isoformas fueron descritas por primera vez en el plexo mientérico del intestino de ratas posnatales y adultas (Dolatshad et al., 2002), demostrando que las isoformas GFRa2a y GFRa2b son idénticas a las de ratón y humano, mientras que la isoforma GFRa2c muestra una pequeña delección en el gen con respecto a la isoforma en ratón y humano (Dolatshad et al., 2002).

B) EXPRESIÓN

Las distintas isoformas de GFRa2 se expresan en ratón, rata y humano. En rata se expresan en el plexo mientérico del intestino (Dolatshad et al., 2002).

En ratón y humanos, los mayores niveles de expresión de GFRa2 se observaron en el cerebro, bazo, pulmón y testículo mientras que en el corazón, el hígado, músculo esquelético y el riñón se han encontrado cantidades más bajas de GFRa2 (Too, 2003).

Se ha demostrado que GFRa2 es esencial para el desarrollo de los subconjuntos de las neuronas entéricas y del parasimpático y en el páncreas se ha demostrado que las fibras del nervio parasimpático y las células Schwann dentro y alrededor de los islotes pancreáticos expresan GFRa2. En los ratones knockout para GFRa2 la inervación parasimpática de los islotes se reduce profundamente. Los ratones GFRa2 knockout presentan un déficit neuronal en la inervación colinérgica del tracto digestivo, incluyendo las glándulas salivales y el páncreas exocrina y el intestino delgado (Rossi et al., 2005).

Es interesante el hecho de que en el intestino embrionario los niveles de GFRa1 sean elevados y decrezcan después del nacimiento, sucediendo todo lo contrario para el receptor GFRa2 (Naveilhan et al., 1997; Rossi et al., 1999;

Widenfalk et al., 2000). Por tanto, los eventos tempranos en el desarrollo del sistema nervioso entérico se llevan a cabo a través del sistema GDNF-GFRa1, resultando su knockout en un fenotipo más severo. El sistema NTN-GFRa2 tiene importancia en los estadios más tardíos del desarrollo, y/o en el mantenimiento del sistema nervioso entérico maduro. El examen de ratones deficientes en el receptor GFRa2 y en su ligando Neurturina revelan que la densidad de la sustancia P que contiene células ganglionares del nervio mientérico así como la densidad del plexo mientérico es ligeramente menor, correlacionado con un déficit en el ritmo de la actividad contráctil. Los ratones knockout para GFRa2 crecen poco después del destete y los mecanismos de este deterioro del crecimiento siguen siendo poco claros (Rossi et al., 2003).

En el sistema nervioso se ha demostrado que GFRa2 es el correceptor predominante en las neuronas postnatales de los ganglios de las raíces dorsales (Luo et al., 2007). También está presente en diferentes ganglios como puede ser el SCG y en diferentes zonas del SNC como pueden ser la sustancia negra, bulbo olfatorio o asta dorsal de la médula espinal, tálamo e hipotálamo, predominando en el córtex cerebral y los lóbulos frontal y occipital (Quartu et al., 2007).

1.2.3.- LIGANDOS PERTENECIENTES A LA FAMILIA GDNF (GFL)

Esta familia está formada por cuatro ligandos: Glial cell line derived neurotrophic factor (**GDNF**), Neurturina (**NTN**), Artemina (**ART**) y Persefina (**PSP**) a los que se les denomina GFLs (Ligandos pertenecientes a la familia de GDNF) (fig. 7).

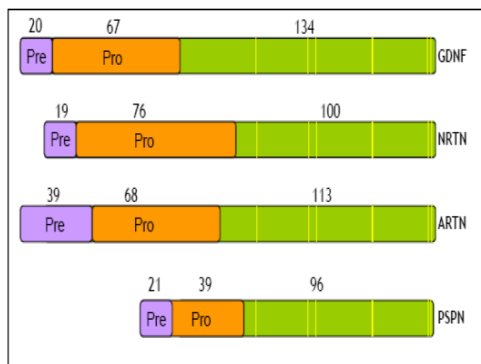


Fig. 7.- Estructura esquemática de los miembros de la familia del GDNF. Se muestra la longitud relativa de cada uno de ellos (como número de aminoácidos). La forma madura está representada en color verde, la secuencia que corresponde a la forma pro está en marrón y la forma precursora en violeta. En amarillo están las cisteínas conservadas.

Se ha demostrado que juegan un papel fundamental tanto en los eventos que se producen durante la organogénesis como a la hora de mediar la supervivencia y diferenciación tanto de células del sistema nervioso como de otros tejidos periféricos.

Al igual que otras proteínas de secreción, también los miembros de esta familia son primero sintetizados en una gran variedad de tejidos como polipéptidos precursores, pre-GFL, pro-GFL. Estos serán procesados a proteínas maduras mediante rotura proteolítica y después secretados (Rosenthal, 1998), siendo funcionales como homodímeros.

Una vez liberados pueden unirse a sus receptores, ya sea exclusivamente a un receptor GFR- α (GDNF-family receptor α), o al dímero GFR- α / RET (rearranged during transfection) (Jing et al., 1996; Trupp et al., 1998). Cada receptor GFR α protagoniza interacciones específicas con diferentes miembros de la familia GDNF.

Los ligandos de la familia GDNF (GFLs) pertenecen a la superfamilia del TGF- β (transforming growth factor β). Su parentesco evolutivo se ve reflejado en su estructura cristalina ya que conservan siete residuos cisteína que conforman un motivo estructural denominado el “nudo de cisteína”, consistente en tres puentes disulfuro por los que permanecen unidos estos residuos aminoacídicos. Se indica entre paréntesis el número de aminoácidos que se encuentran entre las cisteínas.

Familia del TGF- β :

----- Cys (25-28) Cys (3) Cys (28-32) Cys Cys (30-34) Cys (1) Cys (1) COOH

Familia de GDNF:

----- Cys (26) Cys (3) Cys (28) Cys Cys (28) Cys (1) Cys (1) COOH

Esta estructura está implicada en la estabilidad de la proteína y en la formación del dímero (fig. 8). Al igual que el TGF- β , la estructura del monómero de GDNF está caracterizada por pares de cadenas β -antiparalelas conectados por “loops”, y una región helicoidal en el lado opuesto (Eigenbrot and Gerber, 1997). Los dos protómeros que forman el dímero funcional de GDNF se asocian a través de la cola y la cabeza respectivamente, para formar una estructura alargada que posee una región rica en cisteínas en el centro de la estructura flanqueada por las dos hélices.

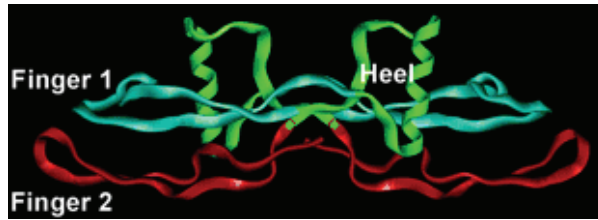


Fig. 8.- Estructura tridimensional del dímero de GDNF

Los miembros pertenecientes a la familia GDNF no comparten con la familia TGF- β más del 20% de homología aminoacídica. Sin embargo, entre ellos sí poseen una similitud de un 40%, presentando en los “loops” la más alta variabilidad.

1.2.3.1.- NEURTURINA: LIGANDO ESPECÍFICO DE GFRA2

A) DESCUBRIMIENTO

Neurturina (NTN) fue descubierta gracias a la observación de que un factor termoestable presente en el medio donde crecían las CHO (Células de ovario de hámster chino) promovía la supervivencia de diversos cultivos neuronales de ratas neonatas (Kotzbauer et al., 1996). Este factor fue purificado obteniéndose una proteína de 25 kDa que conservaba su actividad promotora de la supervivencia. Actúa a través del receptor GFRA2, aunque también puede interactuar con menor afinidad con GFRA1 y GFRA3.

B) ESTRUCTURA

Neurturina fue aislada de clones humanos y de ratones (Heuckeroth et al., 1999) a partir de los cuales se demostró que la preproneurturina estaba formada por dos exones.

En ratones su gen está localizado en el cromosoma 17 (Heuckeroth et al., 1999). Contiene una secuencia de lectura abierta que codifica una proteína de 195 aminoácidos con una secuencia señal de 19 aminoácidos y una pro-región de 76. La proteína madura es de 100 aminoácidos y se obtiene después de su procesamiento en el sitio proteolítico de corte RXXR, dándonos una proteína de 11.5 kDa y un 42 % de similitud con GDNF (Kotzbauer et al., 1996).

C) DISTRIBUCIÓN Y ACCIONES BIOLÓGICAS

Se han detectado diferentes niveles de expresión de Neurturina en ratas adultas y embrionarias.

En el Sistema nervioso está implicada en la supervivencia de neuronas del sistema nervioso periférico, neuronas del simpático (SCG), del parasimpático, sensoriales y entéricas (Heuckeroth et al., 1999; Kotzbauer et al., 1996).

Factores promotores del crecimiento y Factores Neurotróficos entre los que se encuentran Neurturina o GDNF promueven la diferenciación de células pluripotenciales de ratón en neuronas dopaminérgicas. Análisis por RT-PCRs y dobles inmunofluorescencia demuestran un aumento significativo de la

supervivencia, así como de la enzima tirosina hidroxilasa y del transportador de Dopamina en estas células tratadas (Rolletschek et al., 2001).

En el Sistema endocrino Neurturina se expresa en la tiroides, en la Glándula adrenal y en la Hipófisis.

En la Tiroides se expresa en las células epiteliales de los folículos tiroideos (Xian et al., 1999).

En la glándula adrenal se le supone un papel en la secreción de mineralocorticoides, debido a un posible papel autocrino en la zona glomerulosa, por la co-localización de su receptor GFRa2 o la regulación de la mitogénesis (Xian et al., 1999).

En la Hipófisis se ha demostrado su expresión únicamente en el lóbulo intermedio de la hipófisis de rata y no en los lóbulos anterior y posterior (Widenfalk et al., 1997). En cuanto a la expresión en la hipófisis de su receptor GFRa2 se puede decir que no ha sido detectada su expresión en ratas embrionarias y que no se dispone de información de lo que ocurre en las adultas (Widenfalk et al., 1997). Al igual que NGF y BDNF y sus receptores, Neurturina puede estar funcionando como una hormona secretada, un factor trófico o tener funciones paracrinas o autocrinas, dependiendo de si su receptor se expresa en su misma célula (Xian et al., 1999).

En el sistema digestivo Neurturina se localiza en el Intestino y en las Glándulas Salival y lacrimal.

En el Intestino se ha podido comprobar que en el intestino embrionario los niveles de GFRA2 se van elevando, proceso que también continúa después del nacimiento (Naveilhan et al., 1997; Rossi et al., 1999; Widenfalk et al., 1997). Esto es indicativo de la importancia del sistema NTN-GFRA2 en los estadios más tardíos del desarrollo, y/o en el mantenimiento del sistema nervioso entérico maduro. Hay estudios *in vitro* que revelan que Neurturina, al igual que GDNF, influencia el desarrollo de neuronas entéricas (Heuckeroth et al., 1999). Esta hipótesis está apoyada por estudios *in vivo* como el examen de ratones deficientes en el receptor GFRA2 y en su ligando NTN, donde se demuestra que la densidad del plexo mientérico es ligeramente menor, correlacionado con un déficit en el ritmo de la actividad contráctil (Heuckeroth et al., 1999; Rossi et al., 1999).

Las Glándulas Salival y lacrimal ambas expresan Neurturina durante el desarrollo (Widenfalk et al., 1997), mientras que RET y GFRA2 se expresan en las neuronas del ganglio parasimpático que las inervan (Heuckeroth et al., 1999; Rossi et al., 1999; Widenfalk et al., 1997). Esto indica que Neurturina funciona como un verdadero factor neurotrófico que provoca la supervivencia de estas neuronas en el desarrollo, guiando al axón hacia su destino definitivo y manteniendo el tamaño neuronal. Esto concuerda con los datos obtenidos con los ratones knockout para Neurturina (Rossi et al., 1999) en los que estos ganglios perdían su inervación parasimpática.

A nivel del Sistema reproductor encontramos Neurturina tanto en los testículos como en los ovarios.

En los Testículos, su distribución en células de Sertoli, espermatocitos y espermátidas, pero no en espermatogonias y la co-localización de su receptor hace

pensar en su posible implicación en la maduración de las células germinales, como ya habíamos visto con GDNF (Widenfalk et al., 2000; Xian et al., 1999).

En los Ovarios al igual que en testículo, parece implicado en la maduración de oocitos de los folículos en desarrollo dada su expresión en las células de la granulosa de los folículos primarios pero no en oocitos o en el cuerpo lúteo en regresión (Xian et al., 1999); mientras que su receptor (GFRa2) está presente en la línea celular germinal (Widenfalk et al., 1997)

En el Sistema Excretor Neurturina se localiza en el Riñón donde su expresión no solo se produce durante la organogénesis (Widenfalk et al., 1997) sino que también co-localiza con su receptor en las yemas uretrales indicando un papel en el desarrollo similar al de GDNF. Neurturina se expresa en una etapa más tardía del desarrollo que GDNF. Este patrón de expresión secuencial sugiere que la ramificación uretral puede estar primero regulada por una interacción del mesénquima (GDNF) con las yemas uretrales (RET/GFRa1), y posteriormente ser apoyado por un mecanismo autónomo de la célula que expresa tanto NTN como GFRa2. Aunque los ratones deficientes en Neurturina no muestran fallos renales, es posible que esté implicado en el mantenimiento del riñón adulto dada su expresión en la médula (Xian et al., 1999).

1.3.- EL SISTEMA GFRa/RET EN LA HIPÓFISIS

GDNF es el ligando más caracterizado en todos los sistemas ya que fue el primero en ser descubierto, aunque ha sido poco estudiado en la hipófisis. Nuestro laboratorio ha descrito la expresión de GDNF y sus receptores GFRa1 y RET en

la adenohipófisis tanto de rata (Urbano et al., 2000) como de humano (Japon et al., 2002) mediante RT-PCR y western-blot. Esto indica que la adenohipófisis funciona como fuente y diana de GDNF. Debido a la heterogeneidad de esta glándula se llevaron a cabo estudios de co-localización con hormonas adenohipofisarias tanto en ratas como en humanos.

Usando doble inmunofluorescencia en hipófisis de rata, nuestro grupo observó que las únicas células de la adenohipófisis que expresaban los receptores GFRa1/RET eran las células somatotropas, todos los demás grupos de células secretoras eran negativos (Urbano et al., 2000). En humanos se llegó a una conclusión similar, siendo también las somatotropas la diana de GDNF (Japon et al., 2002). Otros autores han detectado una expresión mayor de GDNF en el lóbulo posterior de rata que en el anterior. Se relaciona esta expresión en la neurohipófisis con el soporte y mantenimiento de su inervación hipotalámica, ya que estas fibras nerviosas poseen los receptores RET, GFRa1 y GFRa2.

En cuanto a la expresión en la hipófisis de GFRa2 se puede decir que no ha sido detectada su expresión en ratas embrionarias mediante hibridación in situ y no se dispone de información de lo que ocurre en las adultas (Widenfalk et al., 1997). En ratones los resultados son algo más concretos. GFRa2 es detectado mediante hibridación in situ en la hipófisis embrionaria de ratones, desde la etapa E10 hasta E16 y en E18 no se detecta ya su expresión, a partir de aquí no existen datos. En un principio este receptor se detecta únicamente en la hipófisis posterior, no en la bolsa de Rathke, pudiendo estar implicado en su desarrollo (Golden et al., 1999).

Cabe destacar que no existen estudios que demuestren con que tipo celular co-localiza el receptor GFRa2 ni qué papel fisiológico puede llevar a cabo en la hipófisis, salvo los estudios realizados por nuestro grupo.

1.4.- CONTROL PARACRINO DE LA ADENOHIPÓFISIS

Las interacciones paracrinias se definen como la comunicación entre células de un tejido, esta comunicación, se realiza a través de sustancias químicas, que son usadas como mensajeros locales.

Las células secretoras adenohipofisarias están condicionadas por un gran número de diferentes factores. Los factores hipotalámicos (activadores o inhibidores de la secreción), factores procedentes de los órganos diana de las hormonas hipofisarias y factores producidos por la propia glándula (interacciones autocrinas/paracrinias) (fig. 9).

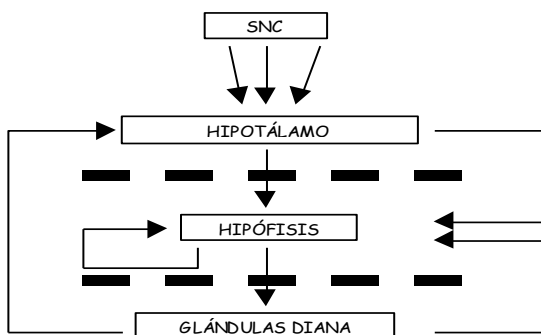


Fig. 9.- Control Paracrino de la Hipófisis. Interacciones autocrinas/paracrinias.

Como hemos visto en la descripción de la anatomía de la hipófisis anterior, ésta es la fuente de seis hormonas clásicas, ACTH, GH, PRL, TSH, FSH y LH, cada una de las cuales es expresada por un tipo celular diferente.

Estos tipos celulares, surgen durante el desarrollo de un primor dio ectodérmico común conocido como la bolsa de Rathke, lo que significa que tienen un mismo origen celular, es decir, que los distintos fenotipos celulares se originan como consecuencia de la acción de factores de desarrollo específicos de la hipófisis, sobre un mismo tipo celular. Entre estos factores de desarrollo específicos se encuentran factores de transcripción, receptores de superficie, factores hipotalámicos y factores procedentes de tejidos periféricos.

Se sabe que la distribución topográfica de los distintos tipos celulares en la adenohipófisis no es aleatoria sino que viene determinada por la expresión de diferentes factores. La formación de la bolsa de Rathke se produce como consecuencia de diferentes gradientes de expresión de factores de transcripción; SHH desde el ectodermo oral y BMP4 desde el diencéfalo ventral. Posteriormente, una vez formado el rudimento de la bolsa de Rathke, el gradiente de expresión dorsoventral de FGF8, junto al gradiente de expresión ventrodorsal de BMP2 induce que las células primitivas que forman la bolsa de Rathke, expresan los factores de transcripción HESX1, SIX y TLE (represores), PITX1, PITX2 y PROP. A medida que se inicia la singularización de la bolsa de Rathke, esta debe expandirse y se expresan los dominios LIM como LHX3, LHX4 Y ISL-1. Por último, aparecen los subtipos diferenciados de células hipofisarias cada uno con sus factores de transcripción específicos como PIT1 (somatotropas, lactotropas y tiotropas), TPIT (corticotropas) y DAX1/SF1 (gonadotropas) (Li et al., 2002; Zhu et al., 2007). La mutación de estos genes en humanos produce

graves enfermedades como la Displasia Septo-óptica (HESX1) (Carvalho et al., 2003) la deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (PROP) (Deladoey et al., 1999) o el enanismo hipofisario (PIT). A esta patología congénita por suerte no muy frecuente, debemos unir los hipopituitarismos espontáneos infantiles y de adultos tanto aislados como generales que provocan graves alteraciones a largo plazo (fig. 10).

Sin embargo, no se sabe mucho sobre la renovación de las células de la hipófisis a lo largo de la vida y su regulación homeostática durante cambios fisiológicos específicos tales como la pubertad o el embarazo o en condiciones patológicas tales como el desarrollo tumoral. Para explicar estos cambios, se han propuesto tanto la proliferación celular de las células secretoras individuales diferenciadas como la proliferación asimétrica, seguida de diferenciación terminal, de células madre/progenitoras, presentes en la hipófisis, que mantienen la homeostasis de esta glándula y generan las células endocrinas productoras de hormonas (Melmed, 2003; Vankelecom, 2007a).

En estudios realizados mediante un doble marcaje con BrdU y con marcadores específicos de hormonas adenohipofisarias, se ha demostrado que las células hipofisarias pueden continuar dividiéndose después de diferenciarse, actividad que puede ser aumentada bajo ciertas condiciones (preñez, hipotiroidismo, etc.). Sobre el 30% de las células hipofisarias de rata provienen de mitosis de células previamente diferenciadas, sin embargo, las restantes células son producidas por diferenciación de células no diferenciadas, posiblemente de células madre hipofisarias (Melmed, 2003).

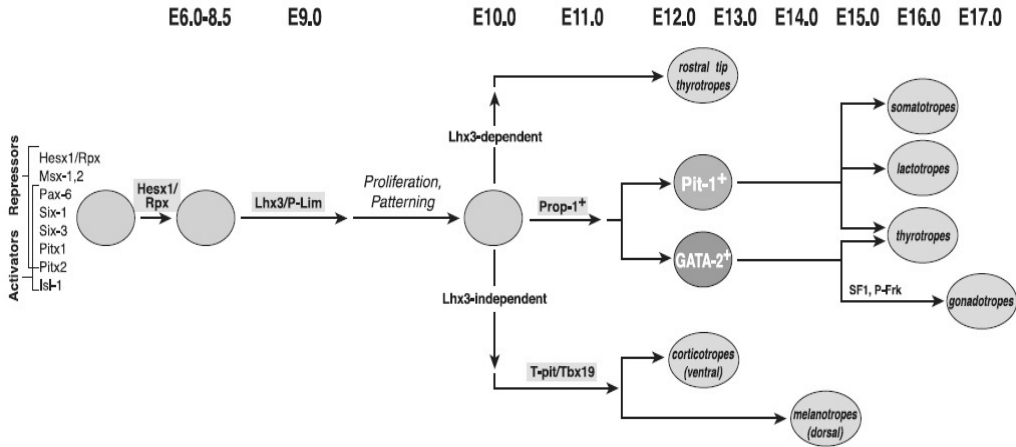


Fig. 10.- Factores de transcripción y de diferenciación de los diferentes linajes celulares. Se indican varios de los factores de transcripción que son críticos para la determinación y la diferenciación de cada tipo celular de la hipófisis, así como su escala temporal durante la organogénesis de la hipófisis de ratón.

Tal como ha sido revisado por Fuchs y colaboradores (Fuchs et al., 2004), las células madre adultas son células que se dividen infrecuentemente y residen en microambientes protegidos o nichos (Moore and Lemischka, 2006), con una baja tasa de erosión telomérica a lo largo de su vida. Las células madre, además, residen frecuentemente en un microambiente tridimensional con un incremento de la expresión de la ruta Wnt/b-catenina. Existen también ciertos genes que son considerados como marcadores de células madre, entre los que se pueden citar los siguientes:

- El gen **POU5f1 (OCT4)**, cuyas funciones parecían en un principio sólo restringidas al mantenimiento de la pluripotencialidad, dada su expresión en

células madre embrionarias, ICM (masa celular interna) del blastocisto, en el ectodermo embrionario, oocitos, y en células germinales primordiales (Scholer et al., 1991), parecen ser ahora más extensas ya que la mera presencia del mRNA o de la proteína de Oct-4 no define la pluripotencialidad ya que es su nivel de expresión la clave de su regulación (Niwa et al., 2000) y por tanto es necesaria la estima cuantitativa de Oct-4 para determinar su actividad. El nivel preciso de Oct-4 puede inclinar la balanza hacia diferentes destinos, sus efectos dependen de la concentración existente en el núcleo (Niwa et al., 2000). Esto ha sido demostrado gracias a investigaciones que utilizan la represión/expresión condicionada de Oct4 en células madre embrionarias.

Las células madre embrionarias requieren un nivel crítico de Oct4 para mantener su capacidad de regeneración, una reducción de la expresión normal de esta proteína produce desdiferenciación a trofoectodermo mientras que un incremento en sus niveles puede causar diferenciación hacia endodermo y mesodermo (Niwa et al., 2000). Posteriormente se ha descrito que una expresión sostenida y al alza de Oct-4 media la neurogénesis en células madre embrionarias (Shimozaki et al., 2003), promoviendo la formación del neuroectodermo y la subsecuente diferenciación neuronal.

- Los genes **SOX**, que tienen papeles relevantes en las células madre embrionarias, en adultas y con una función significativa en los tejidos derivados del neuroectodermo (Pevny and Lovell-Badge, 1997). **SOX9** se expresa en células madre progenitoras multipotentes, en algunas áreas del sistema nervioso central (SNC), durante la generación de la cresta neural y neuroglia (Wegner and Stolt, 2005). Las mutaciones del gen Sox9 son responsables de una enfermedad autosómica dominante muy grave llamada *Displasia Campomélica*, en la que los

niños presentan en el momento del nacimiento muchos defectos esqueléticos y extraesqueléticos que incluyen la reversión del sexo y mueren muy jóvenes (Wunderle et al., 1998). **SOX2** juega un papel importante en el desarrollo de células madre embrionarias, y se ha demostrado que ayudan a mantener la pluripotencialidad de las células madre (Kelberman et al., 2006). Las mutaciones en el gen Sox2 causan hipoplasia hipofisaria asociada con hipogonadismo hipogonadotrófico y anomalías encefálicas, oculares y ópticas (Hagstrom et al., 2005; Kelberman et al., 2006).

1.5.- CÉLULAS MADRE

Las células madre se consideran importantes para estimular la regeneración de los tejidos en el individuo adulto. Ampliar el conocimiento sobre la biología de las células madre, específicamente de los mecanismos moleculares y celulares involucrados en las propiedades de auto renovación y diferenciación es imprescindible para su uso en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos, lo que abre la prometedora posibilidad de ser utilizadas como estrategias terapéuticas específicas para reemplazar tejidos afectados de acuerdo a las necesidades fisiológicas del paciente en particular. Todavía existen conflictos bioéticos, religiosos y políticos, además de obstáculos técnicos por superar e interrogantes científicos que resolver antes de empezar a utilizar las células madre para aplicaciones terapéuticas de manera exitosa en el ser humano. Por estas razones es importante continuar con los estudios e investigaciones con el fin de ampliar el conocimiento acerca de la biología de estas células.

1.5.1.- CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE

A grandes rasgos podemos definir cuatro tipos de células madre en base a su potencial de diferenciación en:

Células madre Totipotenciales: aquella célula capaz de crecer y formar un organismo completo donde se incluyen los componentes embrionarios, como son las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo), el linaje germinal, los tejidos que darán el saco vitelino, y los componentes extraembrionario, como la placenta. Aún así, muchos autores consideran que la única célula toti potente es el cigoto.

Células madre Pluripotenciales: que pueden dar origen a progenitores que forman cualquiera de las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo; pero para incluirse dentro de esta categoría una única célula debe ser capaz de diferenciarse en progenitores especializados procedentes de cualquier capa embrionaria; además demostrar funcionalidad de las células diferenciadas tanto *in vitro* como *in vivo* y producir un asentamiento claro y persistente en el tejido. Este tipo de células no pueden formar un organismo completo.

Células madre Multipotenciales: células que solo pueden generar otras células hijas que se diferencian a lo largo de una única línea celular. Por ejemplo, una célula madre sanguínea será capaz de originar de manera exclusiva diferentes tipos celulares maduros y funcionales hematopoyéticos.

Células madre Unipotenciales: Célula capaz de dar lugar únicamente a un tipo de célula particular.

Desde un punto de vista ontogénico, las células madre se pueden clasificar como:

Células madre embrionarias: La célula madre embrionaria (ESC, siglas inglesas de *Embryonic Stem Cell*) por excelencia es el cigoto, formado por la fecundación del óvulo por un espermatozoide. El cigoto es totipotente, es decir puede dar lugar a todas las células del feto y a la placenta. Según se va desarrollando el embrión, sus células van perdiendo esta propiedad (totipotencia) de forma progresiva, llegando a la fase de blastocisto que contiene células pluripotentes en la masa celular interna de las cuales se derivan las ESCs capaces de diferenciarse en cualquier tipo embrionario. Algún trabajo reciente sugiere la capacidad de las ESCs de generar tejidos extraembrionarios como el trofoblasto (Moore et al., 2008). A medida que avanza el desarrollo embrionario se forman diferentes poblaciones de células madre con una potencialidad de regenerar tejidos cada vez más restringida.

Células madre neonatal: son las células madre procedentes de cordón umbilical y/o placenta. Muchos estudios han evidenciado la existencia de distintos tipos de células madre en cordón umbilical, convirtiéndose en una de las fuentes más aceptadas para la obtención de células con capacidad regenerativa de múltiples tejidos. La existencia de células madre hematopoyéticas en la placenta está siendo explorada por múltiples laboratorios (Crisan et al., 2008; Steigman and Fauza, 2007).

Células madre adultas: En un individuo adulto se conocen decenas de distintos tipos de células madre adultas (ASC, siglas inglesas de *Adult Stem Cell*). Son células indiferenciadas que pueden estar presentes en tejidos diferenciados con propiedades de autorrenovación. Se conoce desde hace décadas que son capaces de especializarse en células idénticas a las del tejido de origen, debido a que su capacidad para generar células especializadas suele estar limitada a unos pocos linajes. Generalmente se dividen y producen células progenitoras o precursoras que se diferencian en células con características y funciones especializadas idénticas a las de las células de un tejido específico. Existen en diferentes tejidos como la piel, la médula ósea, la sangre, el hígado, el intestino y el cerebro. Los estudios han sugerido que son muy versátiles y tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares. Dentro de estas células madre adultas encontramos las células madre hematopoyéticas (HSCs), las células madre de origen mesenquimático (MSCs) y células de la sangre y la gelatina de Warthon del cordón umbilical humano.

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) son células adultas que han sido genéticamente reprogramadas para dar origen a una célula madre embrionaria al ser obligados a expresar los genes y los factores importantes para mantener la definición de las propiedades de las células madre embrionarias. Aunque estas células cumplen los criterios para la definición de células madre pluripotentes, no se sabe si las iPSCs y las células madre embrionarias difieren de manera clínicamente significativa. Las iPSCs de ratón fueron descubiertas por primera vez en 2006 (Takahashi and Yamanaka, 2006), y las iPSCs humanas a finales de 2007 (Takahashi et al., 2007). Las iPSCs de ratón demuestran las características importantes de las células madre pluripotentes, como expresión de marcadores de células madre, formando tumores

que contienen células de las tres capas germinales, y son capaces de contribuir a muchos diferentes tejidos cuando se inyectan en embriones de ratón en una fase muy temprana de desarrollo. Las iPSCs humanas también expresan marcadores de células madre y son capaces de generar células características de las tres capas germinales.

Aunque se necesita muchas más investigaciones, las iPSCs ya son útiles para el desarrollo de drogas y modelos de enfermedades, y en un futuro se espera poder usarlas en trasplantes. Actualmente para establecer los factores de reprogramación en las células de adulto se utilizan virus y este proceso debe ser cuidadosamente controlado y probado antes de que esta técnica pueda utilizarse en los seres humanos (Somers et al., 2010). Este descubrimiento revolucionario ha creado una nueva y poderosa forma de "de-diferenciación" celular, además, los tejidos derivados de iPSCs serán casi idénticos al donante de células y por lo tanto, probablemente evitaban el rechazo por el sistema inmune. La estrategia de iPSC, crea células madre pluripotentes que, junto con estudios de otros tipos de células madre pluripotentes, ayudará a en un futuro a aprender a reprogramar las células para reparar tejidos dañados en el cuerpo humano

1.5.2.- CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS MADRE TRONCALES O “STEM CELLS”

Los principales parámetros o propiedades que permiten clasificar las células madre como tal, están sujetos a una amplia variación y dependen en cierto grado de la presencia de estas células *in vivo* o en circunstancias experimentales, es decir *in vitro*. Son básicamente tres propiedades que caracterizan a las células madre si bien pueden expresarlas en distintos grados (Liew et al., 2005).

- ***Auto-renovación (self renewal)***; las células madre tienen capacidad para perpetuarse, mediante divisiones mitóticas simétricas que originan células hijas, de características similares a la célula progenitora. A través de ese proceso, una célula madre puede proliferar para dar lugar a la expansión de un clon. Igualmente un conjunto limitado de células madre, en el seno de un determinado tejido u órgano, puede mantener su número ó incrementarlo ante necesidades homeostáticas cuando tales células estén participando en un proceso de regeneración tisular. Esta capacidad de auto-renovación es la que permite a las células madre mantener el clon indiferenciado durante largos periodos de tiempo, actuando de reservarlo ante distintas necesidades fisiológicas/homeostáticas.

- ***Potencial de diferenciación o pluripotencialidad***; las células madre son pluripotentes, es decir, capaces de diferenciarse a múltiples linajes celulares bajo diferentes estímulos. Abandonan su estado indiferenciado y mediante un proceso de diferenciación, estrictamente regulado, dan lugar a múltiples linajes somáticos: células nerviosas, cardíacas, sanguíneas, etc., adquiriendo las características morfológicas y funcionales propias de estos tipos celulares. Esta propiedad, junto con su capacidad de proliferación ilimitada (regulada por un proceso de división simétrica o auto-renovación), es lo que convierte a las células madre en una fuente importante para la obtención de distintos tipos celulares.

- ***Reconstitución funcional in vivo de un tejido en particular***; lo que significa la diferenciación funcional *in vivo* en células del tejido de origen embrionario y al menos en un tipo celular de un tejido diferente al tejido de origen embrionario inicial (Song et al., 2010a).

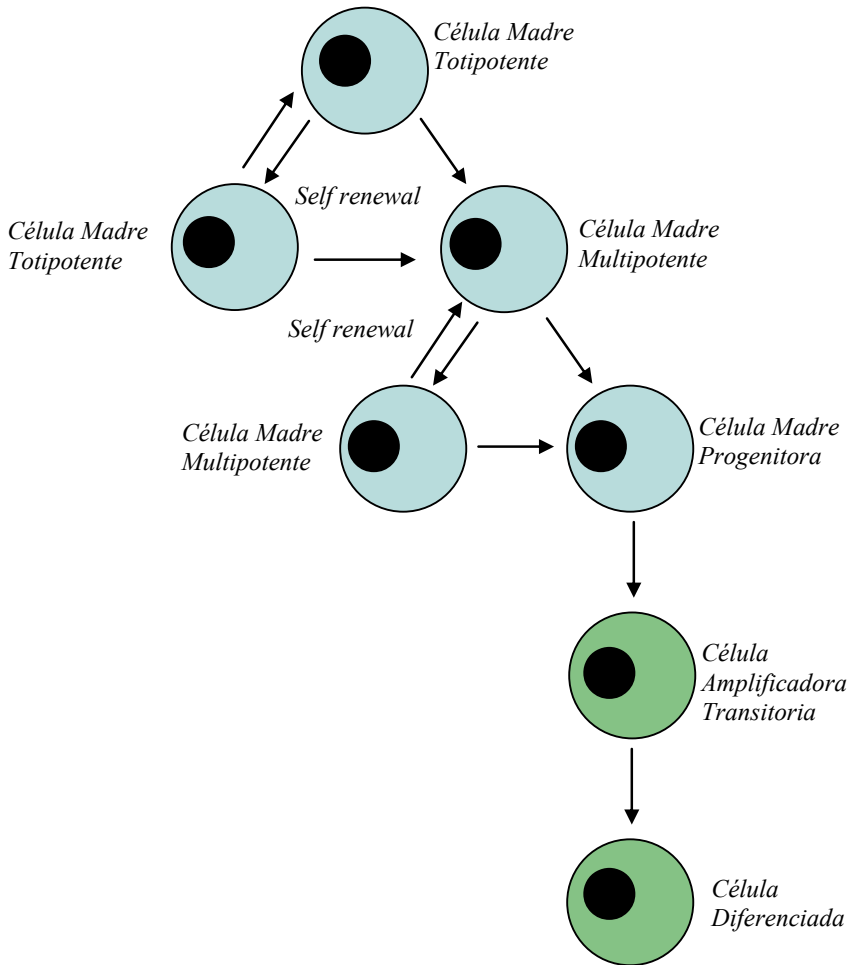


Fig. 11.- **Propiedades de las células madre; auto-renovación (self renewal) y diferenciación.** Las células totipotentes originan todas las células del cuerpo, estas se dividen y dan origen a células madre totipotentes y multipotentes las cuales mediante divisiones simétricas y asimétricas contribuyen a la renovación de las células madre (self renewal) o a la formación de células madre progenitoras, con limitada capacidad proliferativa, las cuales se diferencian a tipos celulares iguales o diferentes al tejido del cual proceden según lo determinen los factores locales y la matriz extracelular que las rodean.

La homeostasis de cualquier tejido adulto o embrionario se mantiene mediante un balance entre la proliferación y la diferenciación. Este balance está finamente controlado por una población celular (células madre) mínimamente representada. Las células madre se caracterizan por dos propiedades, como hemos indicado anteriormente (con independencia del tejido): pluripotencia y auto-renovación. Su capacidad de auto-renovarse les permite, a través de sucesivas mitosis simétricas, perpetuar el clon indiferenciado. Ante necesidades fisiológicas y/o patológicas, la célula madre desencadena un proceso de división, por el que originan dos células hijas desiguales. Una célula hija es idéntica a la célula madre, mientras que la otra célula hija sufre el primer paso hacia la diferenciación (fig. 11). La diferenciación desde una célula madre hasta células maduras funcionales es un complejo proceso regulado a nivel molecular y condicionado por factores exógenos procedentes del ambiente celular. Mediante este proceso, las células madre van originando progenitores/precursores con distinto potencial en cuanto a su pluripotencia. Así, los progenitores van perdiendo su capacidad de autorrenovación y diferenciación con las sucesivas divisiones, convirtiéndose en células funcionales maduras.

1.5.3.- MOLÉCULAS ASOCIADAS A LA AUTO-RENOVACIÓN

El estado indiferenciado de la hESCs puede ser mantenido por factores extracelulares proporcionados por las proteínas de la matriz extracelular (EM, siglas inglesas de Extracellular Matrix), tales como la laminina, así como factores añadidos de manera exógena que pertenecen a las familias de TGF β 1 y bFGF. Recientemente también se ha demostrado que la pleiotropina, un factor de crecimiento sin función conocida en la hematopoyesis, también está implicada en

el self-renewal y proliferación de las células madre hematopoyéticas (Himburg et al., 2010).

Además, se ha descubierto que las principales propiedades de las células madre, como son la auto-renovación y la pluripotencia no son autónomas de este tipo de células, sino que forman parte del control externo a partir del microambiente que define el nicho de células madre.

Se han identificado genes que son necesarios para que las células madre puedan renovarse por sí mismas, entre ellos están los genes Wnt, Hedgehog y Notch (Zhou et al., 2010). Las vías de señalización Wnt/b-catenina, y Notch están implicadas en el self-renewal y proliferación de las células madre. Han sido estudiadas principalmente en las células madre hematopoyéticas (Kim et al., 2009), aunque también se han caracterizado en otros tipos tejidos como por ejemplo en las células madre del epitelio intestinal (Gregorieff et al., 2009).

1.5.4.- DIFERENCIACIÓN ESPONTÁNEA *IN VITRO*

Quizás el método más común en la diferenciación de las células madre sea la creación de cuerpos embrionarios (EBs, siglas inglesas de *embrioid bodies*). Los EBs están constituidos por agrupaciones de células madre cultivadas en flotación y que presentan una morfología similar al embrión en su etapa de gastrulación. Dentro de estos EBs existen múltiples movimientos celulares semejantes a los que ocurren *in vivo* que marcan la simetría embrionaria, la especificación hacia un linaje concreto, etc. En estos EBs se produciría una primera diferenciación hacia una capa germinal concreta que se completaría después, bien añadiendo factores de crecimiento específicos para un determinado

linaje (Wang, 2006), o bien mediante co-cultivo con células adultas que actuarían como un nicho para el crecimiento y diferenciación de las células madre, o incluso el uso de estructuras tridimensionales de polímeros sobre las que crecerían las células diferenciadas. En definitiva, la formación de EBs, además de ser un primer paso hacia la diferenciación específica de la línea, constituyen un hecho clave en la caracterización de las células madre embrionarias. De esta manera, se debe lograr una diferenciación espontánea a tejidos que represente a cada una de las tres capas germinales (endodermo, mesodermos y ectodermo)

1.5.5.- MARCADORES CARACTERÍSTICOS DE ESTADO INDIFERENCIADO

La presencia o ausencia de marcadores específicos indica si las células madre embrionarias en cultivo permanecen o no en el estado indiferenciado.

La siguiente tabla muestra algunos de los marcadores de células madre embrionarias, células madre mesenquimales, neuronales y células madre hematopoyéticas.

MARCADOR CÉLULA MADRE	LINAJE	DESCRIPCIÓN
E-Cadherina	Células madre embrionarias (ES)	Proteína mediadora calcio dependiente de la adhesión celular y desempeñan papeles críticos en el desarrollo normal de los tejidos. Es fundamental para el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células. Si las células madre embrionarias pierden la E-cadherina se diferencian.
OCT-4	Células madre embrionarias (ES)	Factor de transcripción expresado en células madre embrionarias pluripotentes y en células germinales durante el desarrollo normal. Junto con Sox2 y Nanog, es necesario para el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre embrionarias.
Nanog	Células madre embrionarias (ES)	Es un factor de transcripción que mantiene la pluripotencialidad y la capacidad de self renewal de las células madre embrionarias.
SOX-2	Células madre embrionarias (ES)	Factor de transcripción expresado en células madre embrionarias pluripotenciales indiferenciadas y en células germinales durante el desarrollo. Junto con OCT4 y Nanog, es necesario para el mantenimiento del potencial pluripotente.
SSEA4	Células madre embrionarias (ES)	Marcador celular glucosilado que se expresa en células madre embrionarias humanas. Su expresión se observa en células madre pluripotentes durante las primeras etapas del desarrollo embrionario.
Vimentina	Células madre mesenquimales/ células madre neuronales	Proteína del filamento intermedio del citoesqueleto. Vimentina se utiliza como marcador de células madre mesenquimales y neuronales.
Scal	Células madre hematopoyéticas (HSCs)	Se necesita para la regulación del self renewal de las células hematopoyéticas y el desarrollo de poblaciones de células progenitoras específicas. Fuera del sistema hematopoyético, se expresa en células madre progenitoras y en células diferenciadas en una gran variedad de tejidos y órganos.
CD34	Células madre hematopoyéticas (HSCs)	Proteína de la superficie celular de médula ósea indicadora para HSCs y progenitores endoteliales.
Nestina	Células madre neuronales	Es una proteína del filamento intermedio de Clase VI. Se expresa principalmente en células madre del sistema nervioso central.

Tabla 1.- **Algunos marcadores utilizados para la identificación de células madre.** Los genes y marcadores detectados pueden ser utilizados para identificar células madre en poblaciones aisladas. En la tabla se nombran algunos marcadores de células madre embrionarias, células madre mesenquimales, neuronales y células madre hematopoyéticas.

1.5.6.- NICHOS DE LAS CÉLULAS MADRE

En publicaciones recientes se han caracterizado pequeñas zonas donde reside el control de la actividad de las células madre en los diferentes órganos del cuerpo (Song et al., 2010a). Se ha sustentado que las células madre son controladas por un medio ambiente único y específico denominado “**nicho**”.

Gracias a estudios recientes se ha empezado a unificar el concepto de la regulación celular y molecular de éstas células.

El nicho es un mecanismo mediante el cual se regula la división y la diferenciación. Todas las células madre residen en un microambiente generado por las células que las rodean, conocido como "nicho". Las células madre y el nicho interactúan y se influyen entre sí, formando una unidad funcional interdependiente que se traduce en células madre de auto-renovación, diferenciación, de envejecimiento y otras funciones de células madre, incluida su propia muerte.

Las células del nicho bordean la membrana basal y señalizan las células madre para regular la división y bloquear la diferenciación. La división celular puede ser simétrica o asimétrica según lo determinen los factores locales y la matriz extracelular (MEC). Cuando las divisiones son simétricas, una célula madre puede producir dos células madre, y cuando las divisiones son asimétricas, la célula madre se divide y una de las células hijas se mantiene como célula madre y sirve para renovar el pool de células madre manteniendo la conexión con el nicho, mientras que la otra se convierte en una célula progenitora destinada a dividirse y diferenciarse con la adquisición de las características propias del tejido específico al que pertenezca (fig. 10).

También existen las llamadas **células amplificadoras transitorias**, que son menos primitivas que su célula madre progenitora y se dividen más frecuentemente que las células madre, pero tienen un potencial proliferativo limitado y son consideradas el paso inicial para la diferenciación final.

La aumentada capacidad proliferativa de las células amplificadoras transitorias tienen las ventajas de:

- Amplificar cada división de la célula madre y minimizar la necesidad de proliferación de las mismas.
- Minimizar la introducción de errores en el DNA replicado, en la población de células madre.
- Proporcionar nuevas células que están más cercanas a la diferenciación final, y al comportamiento celular funcional específico de cada tejido.

Para poder identificar un nicho, primero deben ser identificadas las células madre y sus marcadores específicos, para luego determinar el medio ambiente en el que residen y sus interacciones con las demás células, factores locales y MEC. Un nicho puede persistir aún en ausencia de células madre residentes y regular la actividad de células exógenas competentes. En contraposición, el destino de las células que se separan es irrelevante para el nicho.

Las células madre aparecen cuando el nicho adquiere la capacidad de secuestrar, preservar y controlar las células embrionarias indiferenciadas. El nicho posee propiedades reguladoras y vías de señalización importantes para definir el destino celular. Estos nichos se pueden encontrar en diferentes tejidos específicos en donde las células madre son reconocidas mediante distintos marcadores, dependiendo de cada linaje. Cada una de estas células, es localizada por vías de señalización intramolecular y factores locales en la MEC, actuando por dos mecanismos básicos, primero, un linaje específico, en donde hay divisiones de

células madre específicas, por ejemplo, una célula madre en el nicho encuentra contacto con el estroma; esta se localiza asimétricamente y orienta su división para asegurar que sólo una célula hija herede la característica de célula madre del nicho y se fije en ese microambiente celular y segundo, si continúa la división celular una nueva célula hija adquiere información sobre-heredada y se relocaliza, al alejarse de las células estromales y sus señales, se dirigen a diferenciarse.

Uno de los cambios recientes en el paradigma de la biología de las células madre ha sido el descubrimiento de que las células madre pueden empezar a diferenciarse en células de los tejidos maduros cuando están expuestas a las propiedades intrínsecas de la matriz extracelular (MEC) tales como, la estructura de la matriz, la elasticidad y la composición. Estos parámetros modulan las fuerzas que una célula pueden ejercer sobre su matriz. Posteriormente las vías mecano-sensibles convierten estas señales en señales bioquímicas y biofísicas que obligan a la célula a diferenciarse a un linaje específico.

Así como los factores de crecimiento están bien estudiados, las propiedades de la MEC son muy dinámicas y están espacialmente y temporalmente controladas durante el desarrollo, lo que sugiere que desempeñan un papel en la orientación de la diferenciación morfogénica y la disposición de las células (Reilly and Engler, 2010).

1.5.7.- PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS

Las células madre adultas (ASCs) son células madre obtenidas de tejidos adultos maduros. Son células indiferenciadas capaces de autorrenovarse para lograr el mantenimiento de una reserva funcional y de diferenciarse hacia tipos

celulares especializados del tejido del cual se originaría. Estas subpoblaciones celulares en los tejidos adultos, están encargadas de reemplazar a las células diferenciadas de tejidos u órganos, con ritmo de recambio elevado y pueden reactivar sus funciones para la diferenciación celular, según determinadas señales de estimulación presentes en su microambiente. Ellas participan en el proceso continuado de división celular, para mantener constante el número de células diferenciadas en tejidos que están sometidos a un desgaste natural por daño, enfermedad o muerte celular.

Las células madre de origen adulto aunque se encuentran en muy pocas cantidades, se ha demostrado su presencia en muchos tejidos: médula ósea, sangre periférica, músculo esquelético, hígado, páncreas, epitelio de la piel y del intestino, pulpa dental, córnea y retina del ojo, y en el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro y la médula espinal. En muchos de ellos realizan una imprescindible tarea de auto-renovación y mantenimiento de la homeostasis tisular. Las células madre adultas de las que disponemos de más conocimientos son las células del sistema hematopoyético de la médula ósea, capaces de regenerar completamente todas las células sanguíneas y del sistema inmunitario (Charbord, 2010). Las células madre adultas, sin embargo, son muy difíciles de aislar y obtener en grandes cantidades. Su capacidad de proliferación *in vitro* es mucho más reducida que la de las ESC o EGC.

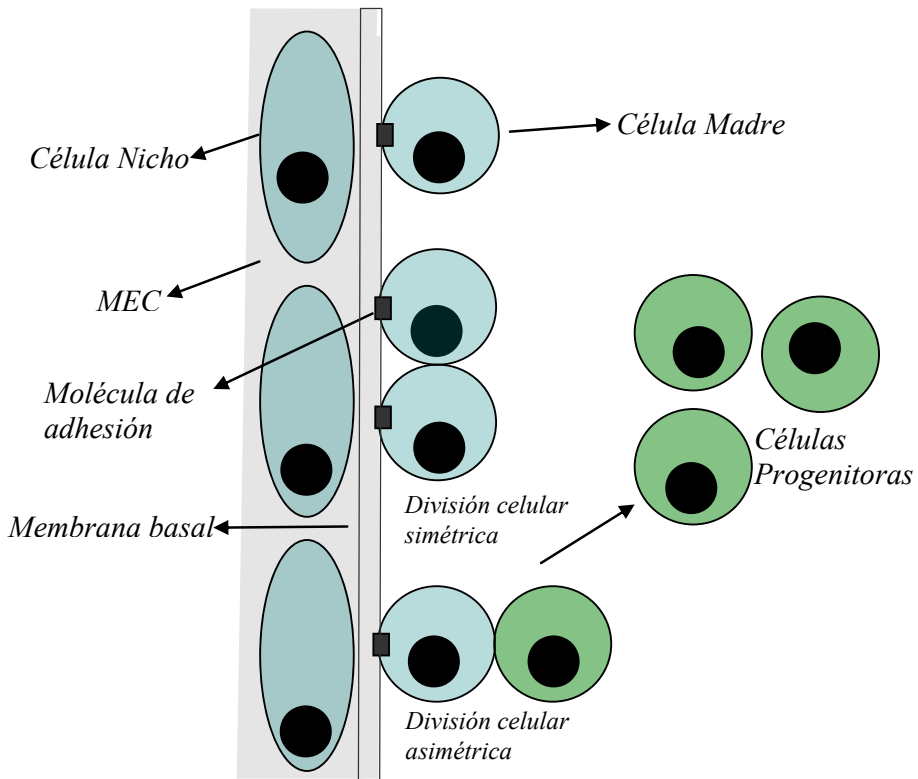


Fig. 10.- Estructura del nicho. Las células del nicho que bordean la membrana basal forman un microambiente único y específico controlado por la matriz extracelular (MEC) y factores locales que regulan la división de las células madre y bloquean su diferenciación.

El potencial de diferenciación de las células madre adultas también es más limitado que el de las ESC o EGC. Sin embargo, actualmente, nuevos experimentos hacen reconsiderar el concepto de la plasticidad de las células madre adultas, puesto que, bajo ciertas condiciones *in vitro*, estas células están demostrando una potencialidad mucho más elevada de lo que se creía hasta ahora. Se ha comprobado que, tanto *in vitro* como en trasplantes *in vivo*, podrían generar

tipos celulares de otros órganos totalmente distintos de los de su origen, incluso de capas germinativas diferentes a la original. Células madre de la médula ósea, de origen mesodérmico, han sido diferenciadas a tejido neural, cuyo origen es ectodérmico (Zheng et al., 2010). Por otro lado, NSC obtenidas del cerebro adulto han generado células hematopoyéticas o incluso muchos otros tipos celulares en un embrión quimérico. En varios estudios se demuestra cómo, después de transplantadas, estas células son capaces de integrarse en el huésped y asumir fenotipos maduros (Brazelton and Blau, 2005; Perry et al., 2009; Schlechta et al., 2010).

Algunas de estas observaciones, sin embargo, podrían deberse a fenómenos de fusión celular en vez de transdiferenciación. Hay un importante debate, en la actualidad, sobre si lo que se observa en estos experimentos son fenómenos de transdiferenciación, desdiferenciación, reprogramación génica, fusión celular o varios de ellos a la vez (Wurmser et al., 2004; Zheng et al., 2010).

Por ahora, sin embargo, no se ha podido demostrar que una sola célula madre adulta sea capaz de generar todos los tipos celulares de un organismo adulto, tal y como lo hacen las ESC y EGC.

Los estudios que se han realizado durante los últimos años demuestran que las ASCs tienen la capacidad de transdiferenciarse, es decir, de dar origen a células de una capa germinal diferente a aquella de la cual ellas provienen. Sin embargo, todavía son muchas las preguntas que quedan por resolver y mucho lo que nos falta por aprender sobre la biología y las posibles aplicaciones terapéuticas de estas células. Las nuevas herramientas disponibles para la investigación básica permiten prever avances importantes durante los próximos

años, en la identificación y entendimiento de la función de los genes implicados en la proliferación y la diferenciación celular y este conocimiento será fundamental en el diseño de nuevas y mejores estrategias en la utilización de las ASCs en los campos de la regeneración tisular y la terapia celular.

1.5.8.- CÉLULAS MADRE EN LA HIPÓFISIS

La existencia de una célula primordial en la hipófisis se propuso hace más de diez años, cuando adenomas hipofisarios humanos excepcionales expresaron simultáneamente hormonas dependientes de Pit-1 (GH, PRL y TSH) más ACTH y hormonas gonadotrópicas, pero la identidad de esas supuestas células madre/progenitoras hipofisarias no está bien establecida. De hecho, tal como ha sido revisado por Vankelecom (Vankelecom, 2007b) se han descrito en la hipófisis diversas células no hormonales, cuya función no se comprende bien, y que se han propuesto como candidatas a células madre/progenitoras hipofisarias, células entre las cuales se incluyen células de la zona marginal que bordean la hendidura hipofisaria, originadas en la bolsa de Rathke, y las células foliculoesteladas (FS) que se localizan por todo el parénquima hipofisario. En general, las evidencias presentadas en apoyo de esta función para los distintos tipos de células mencionadas pueden considerarse poco concluyentes y, además, los grupos descritos de células candidatas a células madre/progenitoras constituyen grupos de células heterogéneos, en los que no es segura la función de cada uno de los tipos de células que los integran.

Recientemente, ensayos realizados con células adenohipofisarias extraídas de ratones han permitido observar que una población colateral (células SD) que excluye de forma eficaz el colorante vital Hoechst 33342 (uno de los métodos

utilizados para la posible identificación de células madre adultas en diversos tejidos), se segrega parcialmente con un grupo de células de la hipófisis que son capaces de formar esferas clonales flotantes en cultivo (Chen et al., 2005) (otro de los métodos habitualmente utilizados para aislar y caracterizar potenciales células madre/progenitoras de numerosos tejidos) y que expresan genes comúnmente reconocidos como marcadores de células madre, tales como *Sca1* y, adicionalmente, en la mayor parte de ellas, *Oct4*, *Nanog*, *nestina*, *promininal1* y *Bmi-1*, así como también moléculas de señalización que han sido implicadas en la renovación de células madre y en la determinación del destino final de esas células en diversos tejidos (componentes de las rutas de señalización de Notch, Wnt o Shh, tales como *Notch-1*, *Hes1*, los receptores *Fzd* o el receptor de Shh *Patched1*). Estas células, sin embargo, eran negativas para el marcador *Prop1*, un factor de transcripción conocido por su expresión exclusiva durante el desarrollo de la hipófisis, cuya deficiencia es responsable del enanismo de Ames en ratones (Nasonkin et al., 2004), y del hipopituitarismo con Deficiencia Combinada de Hormonas Hipofisarias (CPHD) en seres humanos (Wu et al., 1998), una alteración, esta última, en la que la hipófisis experimenta una pérdida progresiva general de células secretoras de hormonas, que parece estar asociada a una pérdida de células progenitoras. Entre las células SD que eran positivas para el marcador *Sca1*, una pequeña proporción mostraba características fenotípicas de las células foliculoesteladas (FS), tales como la capacidad de incorporación del dipéptido β -AlaLys-N ϵ -AMCA o la presencia de la proteína S100, lo que es indicativo de que la población analizada contiene una mezcla variada de diferentes tipos celulares y marcadores. Sin embargo, a parte del profuso estudio descrito sobre expresión de marcadores y capacidad de generación de esferas, en el artículo no se aporta ninguna prueba de que alguna de estas células, o las esferas generadas a partir de

ellas, sean capaces de diferenciarse dando lugar a diferentes linajes celulares adenohipofisarios.

Otros autores (Lepore et al., 2005) han aislado células hipofisarias formadoras de colonias (PCFCs), que son capaces de generar colonias a partir de cultivos primarios de células de hipófisis de ratón, mostrando un notable potencial clonogénico. La mayoría de las células PCFC detectadas exhiben características morfológicas y antigénicas coincidentes con las células FS, incluida la capacidad de incorporar el dipéptido fluorescente β -AlaLys-N ϵ -AMCA (células AMCA+). Entre esas células clonogénicas AMCA+ obtenidas a partir de cultivos primarios, detectaron una porción de células (2%) que expresaban la hormona del crecimiento (GH+), (característica que se encontró también en una proporción de las células AMCA+ detectadas en la propia hipófisis), así como una pequeña proporción (0,6%) de células PRL+, no detectándose células positivas para ACTH, FSH o α GSU. Aunque en el artículo se sugiere que las células PCFC podrían tener la capacidad de diferenciarse en células GH+ o PRL+, no se dan datos que demuestren que estas últimas se generen a partir de las primeras ni se indican las condiciones que permitirían tal diferenciación, ni *in vivo* ni *in vitro*. Tampoco se menciona en el artículo ningún otro marcador fisiológico relevante que permita distinguir aquellas células AMCA+ hipofisarias que, hipotéticamente, pudieran tener capacidad de diferenciarse en lactotropas o somatotropas, de las restantes células del heterogéneo grupo de las AMCA+. Aunque posteriores trabajos del mismo grupo (Lepore et al., 2006) demostraron que la selección de las células AMCA+ por su capacidad de expresar el marcador ACE (la enzima convertidora de angiotensina) permite un enriquecimiento en el porcentaje de células PCFC, la cuestión de la posible capacidad de diferenciación de las células AMCA+ ACE+ seguía pendiente.

Recientemente, se ha descrito (Fauquier et al., 2008) en la hipófisis de ratón adulto la presencia de células que expresan Sox2, un miembro de la subfamilia SOXB1 de factores de transcripción que se requiere para mantener las células con su capacidad pluripotencial en varias poblaciones de células madre, en el embrión de ratón previo a su implante, y para el mantenimiento de sus células homólogas *in vitro*, las células ES (Embryonic Stem Cells). Estas células Sox2+, que representan el 3-5% de las células del lóbulo anterior, parecen corresponder a las células FS y células de la zona marginal. En la hipófisis de los ratones adultos, las células que expresan Sox2 expresan también E-cadherina (un marcador células adultas FS y de la zona marginal comúnmente abreviado como E-cad), aunque no todas ellas expresan S100. La mayor parte de las células Sox2+ E-cad+ expresan también Sox9, aunque un 1% de las células Sox2+ E-cad+ de la hipófisis adulta no expresan Sox9. El cultivo de células dispersas de adenohipófisis en condiciones que permitieron la formación de esferas no adherentes permitió observar que las células formadoras de las esferas parecen ser Sox2+ E-cad+, pero la expresión de Sox9 o S100 sólo pudo observarse en ellas tras 6-7 días de cultivo. Las células Sox2+ E-cad+ Sox9- en cultivo fueron capaces de diferenciarse dando lugar a todos los tipos de células endocrinas presentes en la adenohipófisis, así como en células FS S100+. Las células Sox9+, en cambio, fueron incapaces de generar esferas secundarias a partir de monocapas de estas células. Todo esto parece indicar que las esferas no adherentes se forman a partir de las células Sox2+ E-cad+ S100- Sox9- que tapizan la hendidura de la hipófisis, que parecen ser células progenitoras capaces de diferenciarse dando lugar a todas las células endocrinas presentes en la adenohipófisis, mientras que las células Sox2+ Sox9+ de la hipófisis representan células amplificadoras transitorias, con una alta capacidad de dividirse, que han iniciado ya el proceso de diferenciación.

Los resultados de Fauquier *et al.* parecen demostrar la existencia en la hipófisis de ratón de células madre, localizadas tanto en la capa epitelial como también profusamente entremezcladas con las células diferenciadas, capaces de diferenciarse dando lugar tanto a células FS como a cualquiera de las células endocrinas de la adenohipófisis. Sin embargo, estas células Sox2⁺ Sox9⁻ multipotentes carecen de un marcador característico que permita diferenciarlas de las células amplificadoras transitorias Sox2⁺ Sox9⁺, también presentes en la hipófisis, que parecen representar un estadio intermedio transitorio en el proceso de diferenciación y que no son capaces de dar lugar a esferas secundarias en cultivo.

2.- Objetivos

2.- OBJETIVOS

En el momento de empezar este proyecto, nuestro grupo había demostrado la expresión de GDNF, GFRa1 y RET en la adenohipófisis de rata y de humano. De todas las células secretoras de las adenohipófisis, este complejo de receptores RET/GFRa1 y su ligando GDNF se expresa específicamente en las células somatotropas, en las que regula la diferenciación y supervivencia (Japon et al., 2002; Urbano et al., 2000).

Siguiendo con esta línea de investigación estudiamos en la adenohipófisis, mediante PCR, la expresión de otros co-receptores que pertenecían a la familia de co-receptores alpha de GDNF. Detectamos la expresión de los co-receptores GFRa2 y GFRa3, pero sin embargo no detectamos la expresión del co-receptor GFRa4.

El objetivo de esta tesis, se ha centrado en caracterizar las células de la hipófisis que expresan los co-receptores GFRa2 y GFRa3. Concretamente nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1.-** Localizar la expresión de GFRa2 y GFRa3 en la hipófisis adulta de rata. Identificar los tipos celulares que los expresan, mediante la co-localización con marcadores de los seis tipos de células secretoras de la adenohipófisis (hormonas), marcadores de identidad celular (filamentos intermedios) y marcadores de células madre (stem cells).

- 2.-** Una vez demostrada la co-localización de GFRa2 con células que expresan marcadores característicos de células madre nos propusimos:

a) Cultivar las células como cuerpos embrionarios (esferoides) y estudiar en detalle sus características.

b) Diferenciar “in vitro” los esferoides para analizar su potencialidad.

3.- Estudiar la importancia “in vivo” de las células GFRA2 durante el desarrollo postnatal y en modelos de ratones genéticamente modificados.

3.- Materiales y métodos

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- ANIMALES

Las ratas utilizadas procedían del animalario de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), una instalación registrada, en la que se mantienen los animales en condiciones adecuadas, de acuerdo con la legislación (Directiva 86/609/CEE, Real Decreto 223/88 y Orden ministerial 13/10/89).

Las muestras de hipófisis adultas de rata se obtuvieron de ratas macho adultas Sprague-Dowley (200-250 gr, 60 días); para estudiar la expresión durante el desarrollo postnatal de recién nacidos y adultos, se compararon hipófisis de ratas de 10, 20, 30 y 60 días.

Las muestras de hipófisis humanas se seleccionaron del banco de muestras del Departamento de Patología, Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España), de individuos adultos normales. Se requirió el consentimiento informado de los pacientes, siguiendo las directrices del Comité Ético del Hospital.

Los ratones deficientes en Cdk4 se generaron tal como ha sido descrito previamente (Rane S G et al., 1999). Estos ratones se mantuvieron en un contexto mixto 129/Sv x C57BL/6J siguiendo las directrices institucionales del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y el protocolo aprobado por el Comité de Bioética y Cuidado de Animales de la Comunidad de Madrid. Los animales se observaron diariamente y los ratones que mostraban síntomas de enfermedad se sacrificaron de acuerdo con las Directrices para el Sacrificio de Animales por razones humanitarias utilizadas en investigación biomédica.

A efectos comparativos sobre la influencia del estadio de desarrollo, se consideraron ratones adultos aquellos de más de 28 días si eran hembras o de más de 42 días en el caso de machos.

3.2.- INMUNOFLUORESCENCIA EN TEJIDO

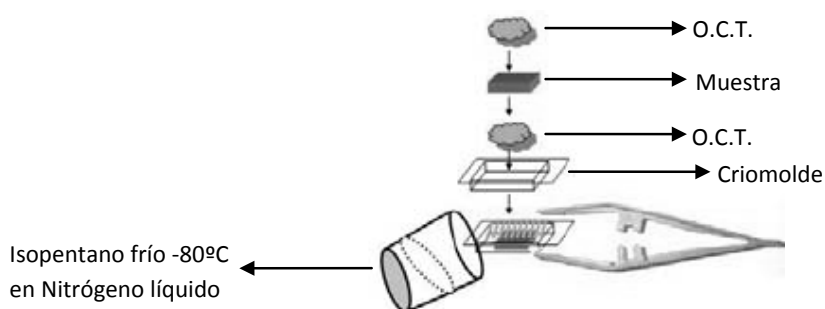
A) Congelación de la hipófisis de rata

1.- Extraer la hipófisis de rata adulta Sprague-Dawley entre 200-250 g.

2.- Introducir la muestra en un criomolde (Sakura 4557) con medio criosolidificable O.C.T.TM (Sakura 4583).

3.- Poner en un frasco isopentano frío a -80°C , introducir el criomolde con la muestra en el isopentano, y este, en el nitrógeno líquido unos minutos hasta que se solidifique el medio criosolidificable.

4.- Guardar la muestra a -80°C .



B) Procesamiento de la muestra

La muestra fue seccionada usando un criotomo en criosecciones de 10 μ m. Los cortes se adhieren a unos portaobjetos especiales (ChemMateTM, DakoCytomation S2024) cuya superficie atrae electrostáticamente las secciones de tejido congeladas e incluidas en el O.C.T.

C) Fijación de la muestra

Se realizaron diferentes tipos de fijaciones, una vez obtenidas la criosecciones, atendiendo al tipo de anticuerpo primario que iba a ser utilizado para incubar la muestra (tabla 1).

Tabla 1						
Anticuerpo primario	Especie	N° Catálogo	Casa Comercial	Tipo de fijación		
				Tejido	Esferoide	Diferenciación
GFRa2	Policlonal conejo	1135	QED Bioscience	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH4Cl 20 min. Metanol 5 min. -20°C Paraformaldehído 0,5% 20 min., NH4Cl 20 min	Metanol 5 min. -20°C	Metanol 5 min -20°C
GH	Policlonal conejo	AFP-C11981A	NIDDK	Metanol 5 min. -20°C Paraformaldehído 0,5% 20 min., NH4Cl 20 min	Metanol 5 min. -20°C	Metanol 5 min. -20°C
GH	Policlonal Guinea pig	AFP222387 790	NIDDK	Metanol 5min -20°C Paraformaldehído 0,5% 20 min., NH4Cl 20 min		

ACTH	Monoclonal	M3501	Dako	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH4Cl 20 min		Metanol 5 min. -20°C
PRL	Monoclonal	E30610M	Biodesign	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH4Cl 20 min	Metanol 5 min. -20°C	Metanol 5 min. -20°C
b-TSH	Policlonal cabra	sc-7813	Santa Cruz B	Metanol 5 min. -20°C		
b-TSH	Policlonal Conejo	AFP-1274789	NIDDK			Metanol 5 min. -20°C
b-FSH	Monoclonal	18-0020	Zymed Laboratories	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH4Cl 20 min		Metanol 5 min. -20°C
b-LH	Monoclonal	MS-9078-P	Neo Markers	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH4Cl 20 min		
Multi-Cytokeratina	Monoclonal	NCL-C11	Novo Castra	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH4Cl 20 min		
E-Cadherin	Monoclonal	C20820-050	BD bioscience	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH4Cl 20 min	Metanol 5 min. -20°C	
b-Catenin	Monoclonal	05-665	Millipore	Metanol 5 min. -20°C	Metanol 5 min. -20°C	
RET	Policlonal cabra	sc-1290	Santa Cruz B	Metanol 5 min. -20°C		
OCT-4	Monoclonal	MAB4305	Millipore	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH4Cl 20 min. Metanol 5 min. -20°C		
SSEA-4	Monoclonal	MC-813-70	Hybridoma bank	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH4Cl 20 min		
KLF4	Policlonal conejo	sc-20691	Santa Cruz B	Metanol 5 min. -20°C		
GFRa3	Policlonal conejo	AB5142	Millipore	Metanol 5 min. -20°C		
Nestin	Monoclonal	Rat-401	Hybridoma bank	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH4Cl 20 min		

PROPI	Policlonal guinea pig	Contra GST-Prop155-230 e His-Prop155-230	Obtenido por grupo inventores	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH ₄ Cl 20 min. Metanol 5 min. -20°C	Metanol 5 min. -20°C	Metanol 5 min. -20°C
Ki-67	Monoclonal	M7248	Dako	Paraformaldehído 0,5% 20 min., NH ₄ Cl 20 min		
Sox-2	Monoclonal	MAB4343	Millipore	Paraformaldehído 4% o.n. antes de congelar y seccionar.		
Sox-2	Policlonal Conejo	AB5603	Millipore	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH ₄ Cl 20 min. Metanol 5 min. -20°C		
Nanog	Policlonal Conejo	Ab5731	Millipore	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH ₄ Cl 20 min. Metanol 5 min. -20°C		
S100 (rata)	Policlonal Conejo	RTU-RTUS100p	Novo Castra	Methanol 5 min. -20°C		
Vimentina (rata)	Policlonal Conejo	(H-84):sc-5565	Santa Cruz B	Methanol 5 min. -20°C		
Sox9	Policlonal Conejo	AB5535	Millipore	Paraformaldehído 0,1% 10 min., NH ₄ Cl 20 min. Paraformaldehído 0,5% 20 min., NH ₄ Cl 20 min		
NTN	Policlonal Cabra	AF477	R&D Systems	Methanol 5 min. -20°C		
Pit-1	Policlonal Conejo	Sc-442	Santa Cruz B	Methanol 5 min. -20°C		
b-Tubulina III	Monoclonal	T8660	Sigma			Paraformaldehído 4% 20 min., NH ₄ Cl 20 min.
Neurofilament	Monoclonal	FNP7,DA2, RmdO2011	Zymed Laboratories			Paraformaldehído 4% 20 min., NH ₄ Cl 20 min

D) Incubación con anticuerpos

Se utilizaron diferentes tipos de anticuerpos primarios, monoclonales y policlonales (tabla 2). Todos los anticuerpos primarios fueron incubados (30 μ l/sección) toda la noche a 4°C.

Los anticuerpos secundarios (tabla 3) fueron incubados (30 μ l/sección) 1 hora a temperatura ambiente. Junto con el anticuerpo secundario, se incorporó un marcador específico nuclear denominado 4',6-Diamino-2-phenylindole dihydrochloride D.A.P.I. (Sigma Aldrich D9542). Este compuesto se excita con luz ultravioleta a una absorbancia de 340 nm; λ_{em} 488 nm, ~~utilizándose~~ a una dilución 1:1000.

Entre cada incubación con el anticuerpo primario y secundario, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS en frascos para lavar portaobjetos (Sigma S6016-6EA) que aproximadamente contenían 50 ml de PBS.

Una vez terminada la incubación con el segundo anticuerpo también se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se montó la inmunofluorescencia con una solución de montaje denominado Fluoro-gel (Electon Microscopy Sciences 17985-10). Transcurridos 30 minutos, se aplicó un medio de montaje orgánico Mountex (Histolab 00851) para evitar que el anticuerpo se secase. Los portaobjetos fueron guardados en oscuridad y a 4°C.

Las inmunofluorescencias dobles se llevaron a cabo en días consecutivos; para impedir señales de fondo debidas a los anticuerpos secundarios; el orden fue

dependiente de la especie del anticuerpo primario: el primer día, cabra, cobaya o conejo; el segundo día conejo o ratón, respectivamente.

E) Análisis de resultados

Para analizar los resultados, se utilizó un Microscopio 25 Confocal TCS-SP2-DMRE a un aumento suficientemente grande (630x, con zoom de 1,5x =>930x, con zoom de 2x =>1000x) como para ser capaz de distinguir partes de la célula, acoplándole láseres de Ar, He/Ne 543 y He/Ne 633 (Leica), y software LCS.

Tabla 2							
AnticuerpoP rimario	Espec ie	N° Catálogo	Compañía	Dilución			
				Tejido	Esferoi de	Diferencia ción	WB
GFRA2	Rabbit	1135	QED Bioscience	1:500	1:50	1:50	1:600
GH	Rabbit	AFP- C11981A	NIDDK	1:800	1:300	1:300	1:1000
GH	Guinea pig	AFP 222 387 790	NIDDK	1:800			
ACTH	Mouse	M3501	Dako	1:100		1:50	
PRL	Mouse	E30610M	Biodesign	1:200	1:100	1:100	1:1000
beta-TSH	Goat	sc-7813	Santa Cruz B	1:200			
beta-TSH	Rabbit	AFP-1274789	NIDDK			1:50	
beta-FSH	Mouse	18-0020	Zymed Laboratories	1: 75		1:50	
beta-LH	Mouse	MS-9078-P	Neo Markers	1:250			
Cytokeratins	Mouse	NCL-C11	NovoCastra	1:45			
E-Cadherin	Mouse	C20820-050	BD	1:75	1:50		
b-Catenin(IF)	Mouse	05-665	Millipore	1:300	1:50		

MATERIALES Y MÉTODOS

b-Catenin(IHQ)	Rabbit	sc-1496	Santa Cruz B	1:200			
Oct4	Mouse	MAB4305	Millipore	1:100	1:50		
SSEA-4	Mouse	MC-813-70	Hybridoma bank	1:50			
Nanog	Rabbit	Ab5731	Millipore	1:800			
Prop1	Guinea pig	Against GST-Prop ₁₅₅₋₂₃₀ and His-Prop ₁₅₅₋₂₃₀ C-terminal: bCA	A.K. Ryan	1:250	1:50	1:50	1:500
S100 (rat)	Rabbit	RTU-RTUS100p	Novocastra	Commercially pre-diluted			
S100 (mouse human)	Rabbit	Z0311	Dako	1:100 (mouse) 1:2000 (human)			
Vimentin (rat)	Rabbit	(H-84): sc-5565	Santa Cruz B	1:200			
Vimentin (mouse)	Guinea Pig	RDI-PROGP53	Fitzgerald	1:25 (Prot K)			
Vimentin (human)	Mouse	clone V9	M0725 Dako	1:500 (Citrate)			
Nestin	Mouse	Rat-401	Hybridoma bank	1:100			
Ki67(rat)	Mouse	M7248	Dako	1:250			
Ki67(mouse)	Mouse	000310Q10(S P6)	Master D	1:200			
Sox2	Mouse	MAB4343	Millipore	1:100			
Sox2	Rabbit	AB5603	Millipore	1:300 (IHQ) 1:500 (IF)			
Sox9	Rabbit	AB5535	Millipore	1:200 (IHQ) 1:500 (IF)			
Sox4	Rabbit	S7318	Sigma	1:50			
KLF4	Rabbit	sc-20691	Santa Cruz B	1:100			

GFRA3	Rabbit	AB5142	Millipore	1:100			
NTN	Goat	AF477	R&D systems	1:100			1:500
Ret	Goat	sc-1290	Santa Cruz B	1:100			
Pit1	Rabbit	sc-442	Santa Cruz B	1:300			
beta-Tubulin isotype III	Mouse	T8660	Sigma			1:100	
Neurofilament (PAN)	Mouse	FNP7,DA2,RmdO2011	Zymed			Commercial y pre-diluted	
b-actin	Mouse	A5316	Sigma				1:1000

Tabla 3

Anticuerpo Secundario	Marcaje	N° Catálogo	Casa Comercial	Dilución			
				Tejido	Esferoide	Diferenciación	WB
Rabbit Anti-Mouse	CyTM2	315-226-047	Jackson	1:1000	1:400	1:400	
Goat Anti-Rabbit	CyTM3	111-166-047	Jackson	1:1000	1:600	1:600	
Donkey anti-Goat	Alexa Fluor 488	A-11055	Molecular Probes	1:250			
Goat Anti-Guinea Pig	Alexa Fluor 488	A-11073	Molecular Probes	1:1500	1:600		
Goat Anti-Rabbit	Biotinilado	BA-100	Vector Labs	1:200			
Goat Anti-Mouse	Biotinilado	BA-200	Vector Labs	1:200			
Anti-mouse+rabbit -HRP ENVISION	HRP		DAKO	Seguir protocolo			
Rabbit anti-mouse IgG	HRP	P0260	DAKO				1:5000
Donkey anti-rabbit IgG	HRP	NA934V	GE Healthcare				1:5000
Goat anti-guinea pig	HRP	106-035-006	Jackson				1:5000

3.3.- TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Para llevar a cabo la inmunohistoquímica y el mapeo de los telómeros, las hipófisis se fijaron en formalina al 10% tamponada a 4°C, se deshidrataron mediante alcoholes graduados y xileno, y se embebieron en parafina. Previamente a ser embebidas, las hipófisis se orientaron con el fin de obtener secciones sagitales o coronales específicas de 5 µM. Previamente a la inmunohistoquímica (IHC), los portaobjetos embebidos en parafina se desparafinaron, rehidrataron, sumergieron en solución de citrato 10 mM y se hicieron accesibles los epitopos mediante tres pulsos de 5 min de microondas de alta energía. Los portaobjetos se lavaron en agua, se bloquearon con una dilución 1:10 de suero normal de cabra (Vector Labs) y se incubaron con anticuerpos primarios (tabla 2). Los portaobjetos se incubaron entonces con anticuerpos secundarios (tabla 3) biotinilados seguidos por el revelado de la señal con un reactivo para la inmunoperoxidasa (ABC-HRP, Vector Labs) y DAB (Sigma). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se analizaron mediante microscopía óptica.

A) Recuento de células inmunoteñidas en secciones de parafina

Las hipófisis se embebieron en parafina, en orientación sagital o coronal. Se llevó a cabo una tinción con hematoxilina en secciones, cada 50 µm, para detectar la mayor sección por cada hipófisis. La inmunohistoquímica se llevó a cabo en tres secciones cercanas a la zona intermedia, separadas por al menos 20 µm. El recuento se realizó en un mínimo de 3 hipófisis por orientación y, considerando un mínimo de 250 células por ratón.

3.4.- WESTERN BLOT

A) Extracción de la proteína

- 1.- La extracción se realizó de adenohipófisis congeladas a -80°C .
- 2.- Se añadió SDS 1% caliente a 95°C a cada muestra, y se trituró el tejido.
- 3.- Se calentó, la muestra con SDS, durante 5 minutos a 95°C .
- 4.- Se añadió Buffer de Shlessinger, cuyo buffer de lisis estaba formado por Hepes 50mM pH 7,5, NaCl 150mM, Glicerol 10%, Tritón 1%, EDTA 5 mM, MgCl 1,5 mM, e inmediatamente antes de su uso se le añadió: 0,1M PMSF (Sigma-Aldrich P-7626), 5mg/ml Aprotinina (Sigma-Aldrich A 6012), 2% Na_3VO_4 (Sigma-Aldrich S-6508), 0,1 M NaPyrofosfato (Sigma-Aldrich S-9515). Se homogenizó la muestra y se mantuvo 20 minutos en hielo.
- 5.- Se centrifugo a 14000 r.p.m. durante 5 minutos y a 4°C .
- 6.- Se recogió el sobrenadante, el cual contenía la proteína, y se guardo a -80°C hasta su cuantificación y posterior uso.

B) Cuantificación de proteína

La cuantificación de la proteína fue realizada mediante el Micro BCATM Protein Assay kit (Pierce 23235). Los valores fueron obtenidos por espectrofotometría usando una longitud de onda de 595 nm.

C) Electroforesis

La electroforesis se realiza en geles SDS-PAGE. Los geles utilizados tienen distinto porcentaje de acrilamida-bisacrilamida dependiendo del peso molecular de la proteína que se quiera detectar. Los microgramos de proteína total cargados también oscilan dependiendo de la proteína que se quiera estudiar.

Los geles de SDS-PAGE tienen dos partes:

- La parte superior o stacking tiene un porcentaje fijo de acrilamida-bisacrilamida que sirve para concentrar la muestra y que entre por igual en la siguiente fase del gel.
- La fase separador o resolving, es la separará las proteínas por su peso molecular. Se prepara a distintos porcentajes de acrilamida-bisacrilamida dependiendo del peso de la proteína que queramos detectar.

Acrilamida – Bisacrilamida (100ml)
Acrilamida (A8887, Sigma): 29,2g
Bisacrilamida (66669, Fluka, se guarda a 4°C):0,8g
<u>Preparación:</u> Se disuelve en agua. Luego hay que filtrarlo con un papel de filtro a modo de embudo para evitar que queden partículas sin disolver. Se guarda a 4°C.

Como marcador de pesos moleculares se utilizaron dos: BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, 10748-10) y PageRuler Pre-Stained Protein Ladder (Fermentas, SM0672).

Para cargar en el gel la cantidad de proteína elegida, se le añade hasta 35µl de tampón de carga 1X. Se hierven las muestras a 95°C durante 10 minutos para desnaturalizar bien la proteína y se les da un corto centrifugado.

Tampón de carga 5X
50% glicerol
10% b mercaptoetanol
0.5% azul de bromofenol
0.4M tris pH 6.8
2g SDS

El gel se deja corriendo a amperaje constante, 15mA por gel. Si queremos correr dos geles en la misma cubeta al mismo tiempo tendremos que aumentar el amperaje a 30mA.

Tampón de electroforesis 10X (2 L)	
Tris base	60g
Glicina	288g
SDS	20g
H2O	hasta 2L

D) Transferencia

Una vez obtenido el gel con las proteínas separadas por peso molecular, estas se transfieren a membranas de PVDF (Inmobilon-P, Millipore, IPVH00010, tamaño de poro 0,45 μ m). Para poder transferir a este tipo de membranas primero hay que activarlas, para ello:

- 1.- Se deja 1 minuto en metanol en agitación constante.
- 2.- Se hidrata la membrana en H₂O durante 5 minutos, también en agitación constante.
- 3.- Se estabiliza en el tampón de transferencia durante 5 minutos.

La transferencia se realizó mediante el sistema en semiseco (SIGMA, Z34, 050-2). Se utilizan tres tipos de tampón de Transferencia: A, B y C.

Tampón de transferencia A
E-aminocaproic acid 0,4M + TRIS 0,25M 100ml
Isopropanol 200ml
H2O 700ml
Tampón de transferencia B
TRIS 1,25M 20ml
Isopropanol 200ml
H2O 800ml
Tampón de transferencia C
TRIS 0,25M 200ml
Isopropanol 200ml
H2O 600ml

1.- Primero se mojan 3 papeles whatman cortados del mismo tamaño que el gel y la membrana (normalmente 10x8cm) en el tampón C y se colocan sobre la superficie del sistema de transferencia.

2.- Luego se añaden 2 papeles whatman (también 8x10cm) mojados en tampón B.

3.- Se añade la membrana de PVDF activada y estabilizada en tampón B.

4.- Se añade el gel y 3 papeles whatman embebidos en tampón A.

5.- Se transfiere el gel durante 1h y 30 minutos (menos tiempo en el caso de que se quieran transferir proteínas de bajo peso molecular) a amperaje constante que depende de los cm² totales: 0,8mA x cm².

E) Inmunodetección

1.- Se lava la membrana con PBS durante 5 minutos en agitación para eliminar los restos de acrilamida.

2.- Se bloquea en solución de bloqueo durante un mínimo de 2h a temperatura ambiente en agitación o toda la noche a 4° C.

Solución de bloqueo (100ml)
10ml TBS 10X
I-Block™ (Tropix, AI300) 0,2g
Se disuelve en H ₂ O
Se calienta para disolverlo. Se deja enfriar y se añade 0.1% Tween-20
TBS 10X
Tris-Base 0,2M
NaCl 1,37M
Se ajusta el pH a 7.6
El resto de H ₂ O

3.- Se incuba el primer anticuerpo toda la noche a 4°C o bien 1h a temperatura ambiente en solución de bloqueo en agitación. La dilución del primer anticuerpo difiere según el anticuerpo que se vaya utilizar (tabla 2).

4.- Se realizan 5 lavados de 10 minutos cada uno con solución de lavado.

Solución de lavado (900 ml)
TBS 10X 60 ml.
Tween-20 (Sigma, p-9416) 1,8 ml (polyoxyethylenesorbiton monolaurate)
Se disuelve en H ₂ O

5.- Se incuba con el segundo anticuerpo durante 1h a temperatura ambiente en solución de bloqueo. Se utilizan distintos anticuerpos secundarios (tabla 3).

6.- Se realizan 5 lavados de 10 minutos cada uno en solución de lavado.

7.- Se deja la membrana en reposo 1 minuto en el sustrato ECL (PIERCE, 32106). El volumen que hay que añadir de sustrato depende del tamaño de la membrana: 0,125mL de ECL por cada cm² de membrana. (NOTA: aproximadamente 5ml por membrana 8x10cm).

Sustrato ECL (Pierce)
Se mezclan los dos reactivos en un volumen 1:1
Se prepara en un tubo opaco ya que es sensible a la luz.

Se colocan las membranas en un casete de autoradiografía con películas fotográficas (FUJI MEDICAL X-RAY FILM N°8U) y se revelan las películas a distintos tiempos en función de la señal obtenida.

D) Stripping

Solución de stripping
62,5mM Tris HCl
2% SDS
100mM b-Mercaptoetanol

Cuando la misma membrana se quiere incubar con distintos anticuerpos sucesivos es necesario eliminar el anticuerpo anterior y que este no interfiera en la nueva detección.

Para ello:

1.- La membrana se lava 4 veces con solución de lavado durante 10 minutos cada una para eliminar la solución del sistema de detección.

2.- Se deja la membrana en un baño caliente (55°C) en la solución de stripping durante 30 minutos. Es importante que la solución de stripping esté en un volumen más que suficiente ya que a la temperatura de “estripado” puede evaporarse parte del volumen.

3.- Lavar bien con solución de lavado, 4 veces durante 10 minutos cada vez. Es importante eliminar completamente el b-Mercaptoetanol ya que si no se impedirá la unión del nuevo anticuerpo.

4.- Se realiza el protocolo a partir del apartado E2 bloqueando de nuevo la membrana.

3.5.- FISH CUANTITATIVA CONFOCAL DE TELÓMEROS (TELOMAPEO)

Para llevar a cabo el mapeo de los telómeros, las hipófisis se fijaron en formalina al 10% tamponada a 4°C, se deshidrataron mediante alcoholes graduados y xileno, y se embebieron en parafina. Previamente a ser embebidas, las hipófisis se orientaron con el fin de obtener secciones sagitales o coronales específicas de 5 μ M.

Para llevar a cabo el telomapeo, se hibridaron los telómeros con una sonda de ácido nucleico peptídico (PNA) diseñada para telómeros marcada con el fluoróforo Cy3 (PNA telomere Cy3 probe, de Applied Biosystems) y la longitud de los telómeros se determinó tal como ha sido previamente descrito (Flores et al., 2008). Brevemente, los portaobjetos se desparafinaron mediante tres lavados con xileno (de 3 minutos cada uno), luego se trataron durante 3 minutos con una serie de etanol al 100, 95 y 70%, lo cual fue seguido de un protocolo de Q-FISH para telómeros llevado a cabo tal como está descrito (Samper et al., 2000). Las señales de DAPI y Cy3 se recogieron simultáneamente en canales separados utilizando un microscopio confocal ultraespectral (Leica TCS-SP2-A-OBS-UV) utilizando como lente una PL APO 20x/0.70 PH2, con el software LCS de Leica, y se

generaron para la cuantificación de imágenes proyecciones máximas de pilas de imágenes (10 secciones en pasos de 1,0 μm). El láser DPSS-561 (láser Cy3) se mantuvo a una intensidad constante para capturar todas las imágenes de los tejidos de ratón. Sobre las imágenes confocales se llevó a cabo un análisis cuantitativo de imágenes de alto rendimiento utilizando la plataforma Metamorph (versión 6.3r6; Molecular Devices, Union City, CA). La imagen de DAPI se utilizó para definir el área nuclear y la imagen de Cy3 para cuantificar la fluorescencia de los telómeros. En todos los casos, se restó el ruido de fondo de cada imagen antes de realizar medidas cuantitativas. Para las imágenes de DAPI se estableció el umbral de intensidad de señal, se segmentaron y se convirtieron en imágenes binarias de 1 bit. La máscara binaria de DAPI se aplicó a la correspondiente imagen de Cy3 para obtener una imagen combinada con información sobre la fluorescencia de los telómeros para cada núcleo. La intensidad de fluorescencia de Cy3 (fluorescencia de los telómeros) se midió como "valores medios de gray" (valor total de gray/área de los núcleos) unidades (unidades arbitrarias de fluorescencia). Estos valores de "fluorescencia media de los telómeros" representan siempre la intensidad media en píxeles del Cy3 para el área nuclear total, y no el valor medio de las intensidades individuales de los puntos de los telómeros, descartando con ello que las diferencias en el tamaño nuclear puedan influir en las medidas de las longitudes de los telómeros. Para clasificar los núcleos de acuerdo con la fluorescencia media de sus telómeros se utilizó un código de cuatro colores.

Finalmente, los valores de fluorescencia de los telómeros de cada región histológica se exportaron a Excel y se generaron los histogramas de frecuencias.

3.6.- TÉCNICA DE RETENCIÓN DE BrdU EN TEJIDO

A ratas de tres días se les inyectó subcutáneamente BrdU (Sigma B5002) a una concentración de 50 µg BrdU/g peso corporal en NaCl al 0,9%, dos veces/día durante 3,5 días. 60 días más tarde, se sacrificaron los animales y se congelaron las hipófisis como se ha comentado anteriormente en el punto 3.2 A.

La inmunofluorescencia para BrdU en las criosecciones se realizó de la siguiente forma:

1.- Se fijó con metanol a -20°C durante 10 minutos. A continuación se lavó con PBS en frascos para los lavar portaobjetos que aproximadamente contenían 50 ml de PBS.

2.- Se incubó la muestra con 50 ml de HCl 4M durante 20 minutos. Luego se lavó con 50 ml de PBS.

3.- Se procedió a la incubación (30 µl/sección) con el primer anticuerpo monoclonal Anti-BrdU (BD 555627) usando una dilución 1:400 durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavó 3 veces con PBS durante 5 minutos cada una.

4.- Se incubó (30 µl/sección) con el anticuerpo secundario CyTM2 Rabbit Anti-Mouse (Jackson ImmunoResearch 315-226-047) durante 1 hora a temperatura ambiente utilizándose una dilución 1:1000. Junto con el anticuerpo secundario, se incorporó un marcador específico nuclear denominado 4',6-Diamino-2-phenylindole dihydrochloride D.A.P.I. (Sigma Aldrich D9542). Este

compuesto se excita con luz ultravioleta a una absorbancia de 340 nm; λ_{em} 488 nm, utilizándose una dilución 1:1000. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS.

5.- Se montó la inmunofluorescencia con una solución de montaje denominado Fluoro-gel (Electon Microscopy Sciences 17985-10). Transcurridos 30 minutos, se aplicó un medio de montaje orgánico Mountex (Histolab 00851) para evitar que el anticuerpo se secase. Los portaobjetos fueron guardados en oscuridad y a 4°C.

6.- Para analizar los resultados, se utilizó un Microscopio 25 Confocal TCS-SP2-DMRE a un aumento suficientemente grande (630x, con zoom de 1,5x =930x, con zoom de 2x =>1000x) como para ser capaz de distinguir partes de la célula, acoplándole láseres de Ar, He/Ne 543 y He/Ne 633 (Leica), y software LCS.

3.7.- TÉCNICA qRT-PCR EN TEJIDO

A) Extracción de mRNA

Se realizó la extracción de mRNA de adenohipófisis congeladas a -80°C, tanto de ratas lactantes como adultas, mediante el RNeasy Mini Kit (Quiagen) ya que la eficiencia de extracción de mRNA es crucial para las sucesivas amplificaciones por RT-PCR. Se siguen las instrucciones del kit. El RNA (precipitado final) se diluye en 40µl de H₂O MiliQ estéril.

B) Real-Time PCR en tejido

Se emplea para la detección de la expresión del RNA. Consta de dos partes:

- La retrotranscripción (RT) o síntesis del cDNA
- La amplificación del cDNA mediante la PCR

Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada gen a estudiar (tabla 4). Los primers fueron obtenidos a partir de la secuencia de mRNA del genoma de *Rattus norvegicus* que codifica para cada uno de los diferentes genes utilizados en nuestro análisis. Se diseñaron con el Primer3 y fueron pedidos a SIGMA.

B 1.- RT-PCR (PCR Reverso Transcriptasa)

Una vez obtenido el RNA este se cuantifica en un espectrofotómetro (Termo Spectronic Biomate-3) a una longitud de onda de 260/280nm. Se utiliza 1µg de RNA. Se siguen los siguientes pasos por muestra:

1.- Se mezcla 0,1µl de Random Primers y 1,5µl de DNTPs 10mM. Se calienta a 95°C durante 5 minutos. Se le da un centrifugado corto.

2.- Se le añaden 6µl de Tampón 5x, 3µl de DTT y 1µl de RNase Out. Se calienta a 37°C durante 2 minutos.

3.- Se añade 1,5µl de MMLV.

El protocolo a seguir es:

1.- 25°C durante 10 minutos.

- 2.- 37°C durante 50 minutos.
- 3.- 42°C durante 30 minutos.
- 4.- 95°C durante 5 minutos.

La RT se puede guardar a 4°C por unas horas o a -20°C durante largos periodos de tiempo.

B2.- RT-PCR (Real Time PCR) y análisis del DNA

Utilizamos el termociclador de Applied Biosystem 7300, con placa de 96 pocillos. Se utilizó 3 µl de cDNA obtenido mediante la PCR Reverso Transcriptasa (RT-PCR).

PCR
<i>13,6 µl de H₂O (Vial 1)</i>
<i>1,2 µl de MgCl₂ (Vial 2)</i>
<i>0,1 µl de primer forward 50 µM</i>
<i>0,1 µl de primer Reward 50 µM</i>
<i>2 µl de Syber Green (Vial1)</i>
<i>El volumen total es de 20 µl</i>

El protocolo es el siguiente:

- 1.- 95°C durante 20 segundos.
- 2.- 40 ciclos:
 - Desnaturalización: 95°C durante 2 segundos.
 - Hibridación: 60°C durante 15 segundos
 - Extensión: 72°C 15 min.

Se añade la curva de melting para comprobar que se obtiene un único producto.

Los datos fueron analizados mediante el método delta-CT y los resultados fueron comparados por un método estadístico no paramétrico *t*-test.

Tabla 4			
Gen	Secuencia	Tamaño Amplificación	T° Annealing
<i>Sox2</i>	F-5'- GCTGCCTCTTTAAGACTAGGGC -3'	166bp	60°C
	R-5'- GAGACGGGCGAAGTGCAATT -3'		
<i>PIT-1</i>	F-5' - TTCCAGACCACACCTGAGT -3'	104bp	60°C
	R-5'-ACTTTTCCGCTGAGTTCCT- 3'		
<i>Oct4</i>	F-5'- AGACAACCATCTGCCGCTTCGA -3'	249bp	60°C
	R-5'- CAATGCTAGTGATCTGCTGC -3'		
<i>Sox9</i>	F-5'- AGAGCGTTGCTCGGAACTGT-3'	67bp	60°C
	R-5'- TCCTGGACCGAAACTGGTAAA-3'		
<i>Prop-1</i>	F-5'- GACAGCTGGAGTCAGCCTTT -3'	153bp	60°C
	R-5'- GGAGTAGTGACCGCTCTTGC-3'		
<i>Gfra2</i>	F-5'- TTCAGGCTCGCTTCAATCTT-3'	122bp	60°C
	R-5'- GAGCGAAGCTTCTTGCAGTT-3'		
<i>Ret</i>	F-5'- CATCAAGTTGTACGGGGCTT-3'	134bp	60°C
	R-5'- TGCTCCACTGCTCACATAG -3'		
<i>GH</i>	F-5'- GCAGAGAACTGACATGGAATTG-3'	269bp	60°C
	R-5'- TTTTGAGCAGAGCGTCATC-3'		
<i>Klf4</i>	F-5'-ACCAGGCACTACCGCAAACACA-3'	79bp	60°C
	R-5'-GGTCCGACCTGGAAAAGGCC -3'		
<i>18s</i>	F-5'-CCATCCAATCGCTAGTAGCG-3'	183bp	60°C
	R-5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'		
<i>HPRT</i>	F-5'-CAGTCCCAGCGTCGTATT -3'	139bp	60°C
	R-5'-AGCAAGTCTTTCAGTCTGTGTC -3'		

3.8.- AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS GFRa2 POSITIVAS

1.- Se extraen las 14 adenohipófisis, de ratas adultas de Sprague-Dawley y se ponen en un plato de 60 mm (IWAKI), embebidas en solución DMEN, Dulvecco's Modified Eagles's Medium (Sigma-Aldrich D-6046).

2.- Se transfirieron las adenohipófisis a un tubo estéril de 20 ml (Tubo universal 20ml Deltalab) y se centrifugan a 37°C, 1000 r.p.m. durante 5 minutos.

3.- Se descarto el sobrenadante y se procedió a la dispersión del pellet celular usando una mezcla enzimática disuelta en DMEN con un 20% de HS (horse serum), suero de caballo, (Gibco 16050-122). La mezcla enzimática estaba compuesta por: Colagenasa tipo IA 0,4% (Sigma-Aldrich C-9891) y DNasaI 0,05% (Sigma-Aldrich DN-25). Esta solución fue filtrada por un filtro de 0,22µm (Millipore Express®). El proceso de dispersión incluyó la dispersión mecánica con pipeta de 1000 µl y la activación química -biológica del complejo enzimático, incubando a 37°C, en una atmósfera de aire del 95% y un 5% de CO₂. La fase de incubación se intercaló con la dispersión mecánica. Las fases de incubación comprendieron una primera incubación de 10 minutos y 2 posteriores de 5 minutos cada una.

4.- Se centrifugó la mezcla a 37°C a 1000 r.p.m. durante 5 minutos.

5.- Se elimino el sobrenadante y se lavaron las células con medio DMEN con el 20% de HS para eliminar los restos de encimas. Se repitieron los lavados 2 veces.

6.- Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 480 μ l de DMEN con 20% de HS y 20 μ l (2,5 μ g/ μ l) del anticuerpo policlonal Anti-GFRa2 (tabla 2). Se incubó la suspensión celular durante 30 minutos a temperatura ambiente.

7.- Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 1 ml de buffer compuesto por PBS pH7, 0,5% BSA (Sigma-Aldrich A7888) y 2 mM EDTA y se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 5 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo.

8.- Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 400 μ l del buffer y 100 μ l de Goat Anti-Rabbit MicroBeads (MACS Miltenyi Biotec 130-048-602). Se mezcló y se incubó 15 minutos a 4°C.

9.- Se añadió 1 ml del mismo buffer y se centrifugó a 1000 r.p.m. 5 minutos. Se resuspenden las células en 500 μ l de buffer.

10.- Para sujetar la columna MS (MS Columns, MACS Miltenyi Biotec 130-042-201) se utilizó un sistema de imanes, compuesto por el separador MiniMACSTM, que es donde se coloca la columna, y el MultiStand, que es donde se coloca el separador con la columna. Todo el sistema queda unido mediante interacciones magnéticas.

11.- Para hidratar la columna se añaden 500 μ l de buffer y se deja eluir. A continuación se eluyen los 500 μ l de células por la columna y este paso se repite una segunda vez para incrementar la pureza de la fracción celular separada magnéticamente. La primera fase en eluir son las células que no están marcadas

con el anticuerpo, mientras que las células marcadas con el anticuerpo están retenidas en la columna.

12.- Para eluir las células marcadas con el anticuerpo, se separa la columna del MiniMACSTM y se añade 1 ml de medio. Las células fueron sembradas en placas Nunc de 35mm.

El medio utilizado para eluir las células de la columna dependía de si se iban a cultivar las células madre como esferoides o bien amplificarlas.

Tabla 5: Medio de cultivo de Esferoides: <i>SpherM</i>
<i>DMEN, Dulvecco's Modified Eagles's Medium</i> (Sigma-Aldrich D-6046) 50%
<i>HAMF12</i> (Sigma-Aldrich N-4888) 50%
<i>N2</i> (Invitrogen 17502-048) 1x COMPOSICIÓN. BSA, transferrina, insulina progesterona, putrescina y selenito sódico.
<i>B27</i> (Invitrogen 17504) 1x COMPOSICIÓN. BSA, transferrina, insulina progesterona, putrescina, selenito sódico, biotina L-carnitina, corticosterona, ethanolamina, D(+)-galactosa, ácido linoleico, ácido linolenico, ácido retinoico (vitamina A), selenio, T3 y vitamina E.
<i>Penicilina-Estreptomicina</i> (antibióticos) 10000U/ml de penicilina y 10mg/ml de estreptomicina <u>Preparación:</u> Penicilina/estreptomicina (Sigma, P0781): Se alicuotea y se guarda a -20° C. Las alicuotas están 100 veces concentradas.
<i>Fungizona o Anfotericina B</i> (fungicida) 1%. <u>Preparación:</u> Anfotericina B (Sigma, A-9528): Se disuelve un vial completo (100 mg) en 10 ml de H ₂ O mQ, así es estable a -20° C. Para preparar el stock 100 veces concentrado, se toman 2,5 ml de la disolución anterior y se llevan a 100 ml con H ₂ O. Se filtran y se hacen las alicuotas. Se guarda a -20° C.

Tabla 6: Medio de cultivo célula madre: <u>StemM</u>
<i>KNOCKOOUT D-MEN</i> (Invitrogen 10829018) 80%
<i>KNOCKOOUT SR</i> (Invitrogen 10828028) 20%
<i>NON ESS AMINO ACIDS (100X)</i> (Invitrogen 11140035) 1x
<i>L-GLUTAMINE (100X)</i> (Invitrogen 25030032) 2mM
<i>2-MERCAPTOETHANOL</i> (Invitrogen 31350010) 0,1 mM
<i>b-FGF</i> (Invitrogen 13256029) 4 ng/ml
<i>Penicilina-Estreptomicina</i> (antibióticos) 10000U/ml de penicilina y 10mg/ml de estreptomicina
<i>Fungizona o Anfotericina B</i> (fungicida) 1%.

3.9.- TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA ESFEROIDES

Las células GRFa2 positivas purificadas y cultivadas en SpherM (tabla 4), crecieron como esferoides y trascurridos 7 días se realizó la inmunofluorescencia para GRFa2, OCT-4, E-caderina, PROP, b-Catenina, PRL y GH.

Para ello los esferoides fueron recogidos con una micro pipeta de 5000 μ l y se situaron en unos insertos (Millipore PIEP12R48), en los cuales se iba a realizar la inmunofluorescencia:

1.- Se lavaron los esferoides con PBS y se fijaron con Metanol frío a -20°C durante 5 minutos.

2.- Se lavó con PBS y se añadieron los diferentes anticuerpos específicos para GRFa2, OCT-4, E-cadherina, PROP, b-Catenina, PRL y GH usando diferentes diluciones para cada uno (tabla 2). Se incubaron durante 1h a temperatura ambiente.

3.- Se lavó con PBS y se añadieron los anticuerpos secundarios (tabla 3) que fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente.

4.- Se lavó con PBS y se procedió al montaje de los insertos, para ello se seco el exceso de PBS con papel de filtro, se corto el filtro del inserto y se situó en un cubre con una gota de solución de montaje, Fluoro-gel (Electon Microscopy Sciences 17985-10) y a continuación se colocó en un portaobjetos. Transcurridos 30 minutos, se aplicó un medio de montaje orgánico Mountex (Histolab 00851) para evitar que el anticuerpo se secase. Los portaobjetos fueron guardados en oscuridad y a 4°C.

5.- Para analizar los resultados, se utilizó un Microscopio 25 Confocal TCS-SP2-DMRE a un aumento suficientemente grande (630x, con zoom de 1,5x =930x, con zoom de 2x =>1000x) como para ser capaz de distinguir partes de la célula, acoplándole láseres de Ar, He/Ne 543 y He/Ne 633 (Leica), y software LCS.

3.10.- CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LOS ESFEROIDES MEDIANTE BrdU.

Para realizar el experimento se cultivaron las células GRFa2 positivas con el método de cultivo mencionado anteriormente en el apartado 3.8 y se sembraron en SpherM (tabla 4).

La proliferación de los esferoides se observó, mediante inmunofluorescencia, en el día 1, día 3 y día 7, para ello se añadió BrdU al medio de cultivo a una concentración final de 10 μ M el día anterior a la realización de la inmunofluorescencia.

Usando el microscopio de fluorescencia se realizó el contaje de los esferoides marcados con BrdU, en el día 1, día 3 y día 7. El porcentaje de esferoides marcados, para cada uno de los días, es el promedio 3 cultivos diferentes.

Para la realización de la inmunofluorescencia se procedió del siguiente modo:

1.- Los esferoides fueron recogidos con una micropipeta de 5000 μ l y situados en unos insertos (Millipore PIEP12R48).

2.- Se lavaron los esferoides con PBS

3.- Se fijaron con Etanol 70% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavo con PBS 3 veces, 5 minutos cada una.

4.- Se incubaron con HCl 4M durante 20 minutos.

5.- Se lavaron con PBS y se añadió el anticuerpo específicos para BrdU (BD 555627) usando una dilución 1:50 durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavó 3 veces con PBS durante 5 minutos cada una.

6.- Se incubó con el anticuerpo secundario CyTM2 Rabbit Anti-Mouse (Jackson ImmunoResearch 315-226-047) durante 1 hora a temperatura ambiente utilizándose una dilución 1:100. Junto con el anticuerpo secundario, se incorporó un marcador específico nuclear denominado 4',6-Diamino-2-phenylindole dihydrochloride D.A.P.I. (Sigma Aldrich D9542). Este compuesto se excita con luz ultravioleta a una absorbancia de 340 nm; λ_{em} 488 nm, ~~antibise~~ una dilución 1:200. Transcurrido el tiempo de incubación se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS.

7.- Se procedió al montaje de los insertos, para ello se seco el exceso de PBS con papel de filtro y se corto el filtro del inserto y se situó en un cubre con una gota de solución de montaje, Fluoro-gel (Electon Microscopy Sciences 17985-10) y a continuación se colocó en un portaobjetos. Transcurridos 30 minutos, se aplicó un medio de montaje orgánico Mountex (Histolab 00851) para evitar que el anticuerpo se secase. Los portaobjetos fueron guardados en oscuridad y a 4°C.

3.11.- DIFERENCIACIÓN DE ESFEROIDES

Los esferoides se obtuvieron con el método de cultivo mencionado anteriormente en el apartado 3.8 y se sembraron en SpherM (tabla 5). Una vez transcurridos 7 días se procedió a su diferenciación:

1.- Se aisló cada esferoide con la ayuda de un microscopio óptico y una micro pipeta, y cada uno se situó en un pocillo de los portas para cultivo (Cultureslides, BD Falcon 354118), previamente tratados con Poli- Lisina (Sigma-Aldrich P4832) o con Colágeno tipo IV (Fluka 27663).

2.- Se añadió medio de cultivo SpherM (tabla 5) con el 10% de FBS (Gibco 2009-07) durante toda la noche.

3.- Al día siguiente, el medio se reemplazó durante 15 días por uno de los medios de diferenciación (DifM tabla 7) cambiándose el medio cada 2 días.

4.- Transcurridos 15 días se realizaron las pruebas de inmunofluorescencia. Para ello se aspiró el medio, se lavó con PBS y se realizó la inmunofluorescencia tal y como se describe a partir del apartado 3.2 C.

Tabla 7: Medios de Diferenciación: DifM

<i>DifM1</i>	<i>DifM2</i>	<i>DifM3</i>	<i>DifM4</i>	<i>DifM5</i>
50% Medio condicionado GH4C1 (tabla 9)	50% DEMEN HAM F12	SSM (tabla 6)	DEMEN, HAM F12 1:1	50% Medio condicionado GH3 (tabla 10)
50% Medio SSM (tabla 8)	50% Medio condicionado GH4C1 (tabla 9)	1% FBS	1x B27	50% Medio SSM (tabla 8)
	1x N2	1x N2	FGF 0,5 µg/L	
			GHRH 0,0016 mg/L Grelin 0,0033 mg/L Trasferrina humana 5 mg/L Hidrocortisona 0,0046 mg/L Somatostatina 10 µg/L Insulina 10 mg/L	
			1% penicilina/estreptomicina 1% fungizona.	

Tabla 8: Medio de cultivo SSM
DMEN, Dulvecco's Modified Eagles's Medium (Sigma-Aldrich D-6046) 6,5(v/v)
HAMF12 (Sigma-Aldrich N-4888) 3,5(v/v)
HEPES (Sigma-Aldrich H-3375) 2,4 g/l
BSA (Sigma-Aldrich A-7888) 2 g/l
Glucagón (Sigma-Aldrich G9416) 10 ng/ μ l
FGF (Sigma-Aldrich 13256-029) 0,2 μ g/l
EGF (Sigma-Aldrich E9644) 0,1 μ g/l
Hidrocortisona (Sigma-Aldrich H-0888) 143 μ g/l
Triyodotirosina, T3 (Sigma-Aldrich T-6397) 0,4 μ g/ml
Apo-Trasferrina humana (Sigma- Aldrich T1147) 10 ng/l
NaHCO₃ (Panreac- 141638) 1,8 g/l
FBS (Gibco 2009-07) 10%
Fungizona o Anfotericina B (fungicida) (Sigma, A-9528) 2,5 ng/ml
Penicilina-Estreptomicina (antibióticos) (Sigma, P0781) 10000U/ml de penicilina y 10mg/ml de estreptomicina

Tabla 9: Medio condicionado GH4C1 (recogido, filtrado y alicuoteado transcurridos 6 días de cultivo)
DMEN, Dulvecco's Modified Eagles's Medium (Sigma-Aldrich D-6046) 50%
FBS (Gibco 2009-07) 10%
Penicilina-Estreptomicina (antibióticos) (Sigma, P0781) 10000U/ml de penicilina y 10mg/ml de estreptomicina
Fungizona o Anfotericina B (fungicida) (Sigma, A-9528) 1%

Tabla 10: Medio condicionado GH3 <i>(recogido, filtrado y alicuoteado transcurridos 6 días de cultivo)</i>
DMEN, Dulvecco's Modified Eagles's Medium <i>(Sigma-Aldrich D-6046) 50%</i>
FBS (Gibco 2009-07) 2,5%
HS (horse serum) (Gibco 16050-122) 15%
Penicilina-Estreptomicina (antibióticos) (Sigma, P0781) 10000U/ml de penicilina y 10mg/ml de estreptomicina
Fungizona o Anfotericina B (fungicida) (Sigma, A-9528) 1%

3.12.- TÉCNICA PCR EN CÉLULAS AISLADAS Y DIFERENCIADAS

A) Extracción de mRNA

Se realizó la extracción de mRNA de las células GFRA2 recién purificadas, tanto de la fracción positiva como de la negativa. También se extrajo mRNA de las células GFRA2+ transcurridos 5 días de cultivo como esferoides, así como de muestras obtenidas de células diferenciadas a partir de un único esferoide después de 14 días sobre poli-L-Lisina en medio de diferenciación DifM4. El mRNA se extrajo mediante el RNeasy Mini Kit (Quiagen) ya que la eficiencia de extracción es crucial para las sucesivas amplificaciones por RT-PCR. Se siguen las

instrucciones del kit. El RNA (precipitado final) se diluye en 40µl de H₂O MiliQ estéril.

B) PCR

Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada gen a estudiar (tabla 4).

El protocolo a seguir es:

- 1.- 55°C durante 2 minutos.
- 2.- 95°C durante 10 minutos.
- 3.- 40 ciclos-
 - a.- Desnaturalización: 95°C durante 45 segundos.
 - b.- Hibridación: 60/64°C durante 45 segundos.
 - c.- Extensión: 72°C durante 45 segundos.
- 4.- 72°C durante 10 minutos.
- 5.- 4°C hasta que se guarde a -20°C.

Una vez realizada la PCR el producto se separa en un gel de agarosa a distintas concentraciones dependiendo del peso molecular final del gen amplificado, teñido con 0,5% de Bromuro de Etidio. Como marcador de peso se utilizo el DNA Ladder de Invitrogene (Invitrogene, 15628019).

3.13.- AMPLIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS GPS COMO CÉLULAS MADRE

Las células GFRA2 positivas fueron mediante el método descrito en el apartado 3.8 y cultivadas en distintos medios para poder hacerlas crecer a lo largo de pases consecutivos. La tabla 11 representa un resumen de los distintos tipos de crecimientos celulares obtenidos usando diferentes tipos de sustratos y medios de cultivo.

Tabla 11: Amplificación de células GPS			
<i>Crecimiento como esferoides</i>	<i>Crecimiento como células dispersas y fijadas a la superficie</i>	<i>Crecimiento como Colonias</i>	<i>Crecimiento como esferas compactas</i>
Sin gelatina	Con gelatina	MEF tratados con mitomicina C	Con gelatina
SpherM (Tabla 5)	MEFM (Tabla 12)	StemM (Tabla 6)	MEFM (Tabla 12)
			ESGRO (Chemicon ME9BN2216) 1000 U/ml

Tabla 12: Medio de cultivo MEFM
StemM (tabla 6)
MEFs (medio condicionado StemM) recogido, filtrado y alicuoteado transcurridos 6 días de cultivo sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) tratados con mitomicina C (Sigma-Aldrich M4287) y cultivados en DMEN con 20% de FBS.

4.- Resultados

4.- RESULTADOS

Nuestro grupo había demostrado la expresión del complejo de receptores RET/GFRa1 y su ligando GDNF en la hipófisis anterior de rata y de humano. De todas las células secretoras de las adenohipófisis, este complejo se expresa específicamente en las células somatotropas (Japon et al., 2002; Urbano et al., 2000) en las cuales regula la diferenciación y supervivencia.

Siguiendo con la línea de investigación de nuestro grupo, nos centramos en la caracterización de las células de la hipófisis que expresaban el receptor GFRa2, perteneciente a la familia de receptores alpha de GDNF.

4.1.- LA EXPRESIÓN DE GFRa2 ESTÁ RESTRINGIDA PRINCIPALMENTE A LA ZONA MARGINAL DE LA HIPÓFISIS

Mediante RT-PCR, se observó que GFRa2 se expresa en la hipófisis de rata a niveles similares a los del testículo, en donde ya se habían descrito previamente los receptores GFRa1 y 2 (Hofmann et al., 2005; Meng et al., 2001). En la figura 1 se muestran las bandas de electroforesis correspondientes a los fragmentos amplificados de mRNA de GFRa2 extraídos de hipófisis y de testículo de rata.

Para comprobar si la expresión de proteína de GFRa2 se podía detectar en la hipófisis y la localización en la que aparecía dicha expresión, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con muestras de rata, ratón y humano.

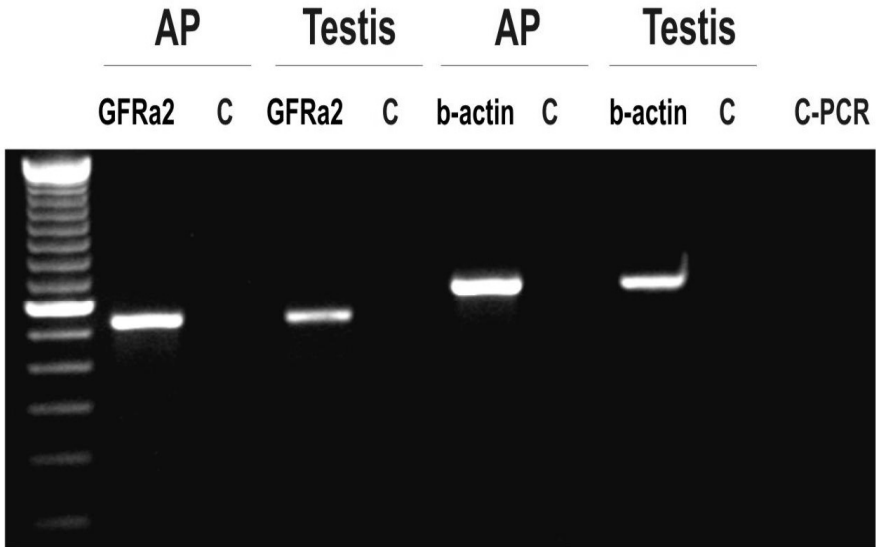


Fig. 1.- **Expresión relativa, respecto a testículo, de GFRa2 en hipófisis.** Se muestran fragmentos específicos del gen GFRa2 y como control de carga b-actina. La expresión del mRNA de GFRa2 en la adenohipófisis es comparable a la del testículo, una glándula bien conocida por la expresión de los receptores GFRa.

Tal como se muestra en la fig. 2, en la hipófisis de roedores (rata y ratón), la expresión de GFRa2 está restringida a un subgrupo claramente diferenciable de células alineadas en una monocapa de células en la zona marginal (MZ) situada alrededor de la hendidura entre el lóbulo intermedio (IL) y la adenohipófisis (véase la fig. 1B correspondiente a hipófisis de rata y ratón).

Para establecer la relevancia para los seres humanos de los hallazgos en roedores, se realizó un estudio similar en hipófisis humanas normales completas. Los resultados, mostrados en la fig. 2B, demuestran que un nicho similar de

células, que expresan GFRa2 está presente también en la zona marginal de la hipófisis humana, alrededor de los denominados quistes remanentes de Rathke (fig. 2C).

GFRa2 es un co-receptor extracelular, del receptor tirosina quinasa RET en hipófisis de rata. Una vez localizadas las células GFRa2 mediante inmunofluorescencia, que también expresan el receptor RET (fig. 3A). Este receptor RET es expresado en la AP por las células somatotropas. Por otra parte, el ligando específico de GFRa2, NTN se expresa en grupos dispersos por la adenohipófisis (fig. 3B). En humanos, mediante inmunohistoquímica, demostramos que las células que rodean los quistes de Rathke, en las cuales localizábamos anteriormente las células GFRa2+, también expresan el receptor RET (fig.3C). También observamos en la inmunohistoquímica de hipófisis humana que el ligando NTN no se expresa en las células GFRa2+ sino en pequeñas agrupaciones de células dentro de la adenohipófisis (fig.3C).

La doble inmunofluorescencia GFRa2/NTN, sugiere que podría haber una señalización direccional implicada en la vía GFRa2/RET/NTN. Esta relación es similar a la existente entre GFRa2/RET/NTN en los nichos presentes en los túbulos seminíferos de los testículos donde RET y GFRa1/GFRa2, mediante sus ligandos GDNF y NTN, juegan un papel importante en la interacción entre multipotencia frente a diferenciación de las células madre germinales (Hofmann et al., 2005; Widenfalk et al., 2000). Del mismo modo, en la hipófisis, el eje NTN/GFRa2 puede modular el balance células madre/progenitoras, de forma diferente del sistema RET/GFRa1 que controla la diferenciación y el destino (diferenciación/muerte frente a supervivencia), de las células somatotropas, a través de la regulación de Pit-1 (Canibano et al., 2007).

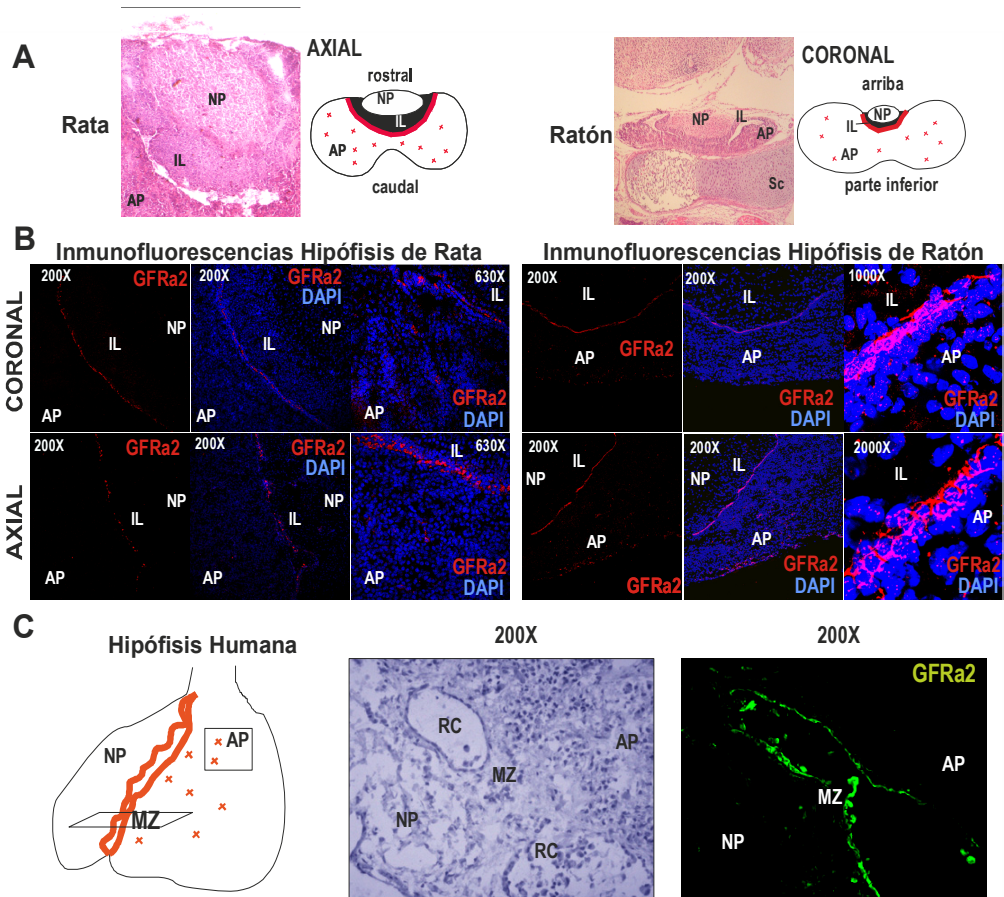


Fig. 2.- Localización de las células GFRa2+ en la zona marginal de la hipófisis adulta de rata y humana. **A)** Secciones coronales y axiales teñidas con hematoxilina y eosina, muestran la localización de la hipófisis bajo el hipotálamo y en la parte superior de la silla turca del esfenoides (Sc), así como la disposición de los tres lóbulos hipofisarios: adenohipófisis (AP), lóbulo intermedio (IL) y neurohipófisis (NP). **B)** Inmunofluorescencia para GFRa2 en hipófisis de rata y de ratón, donde se observa que GFRa2 en la hipófisis se dispone en una línea en la frontera entre AP e IL, y en hipófisis de ratón unas pocas células, con una tinción menos intensa, aparecen dispersas en la AP. Tinción de núcleos con DAPI. **C)** Representa la anatomía de la hipófisis humana con una adenohipófisis anterior (AP) y una neurohipófisis posterior (NP); el límite se denomina zona marginal (MZ) y contiene estructuras dilatadas habitualmente denominadas quistes remanentes de Rathke. Las inmunofluorescencias con anti-GFRa2 demuestran que las células que bordean los quistes de Rathke expresan GFRa2.

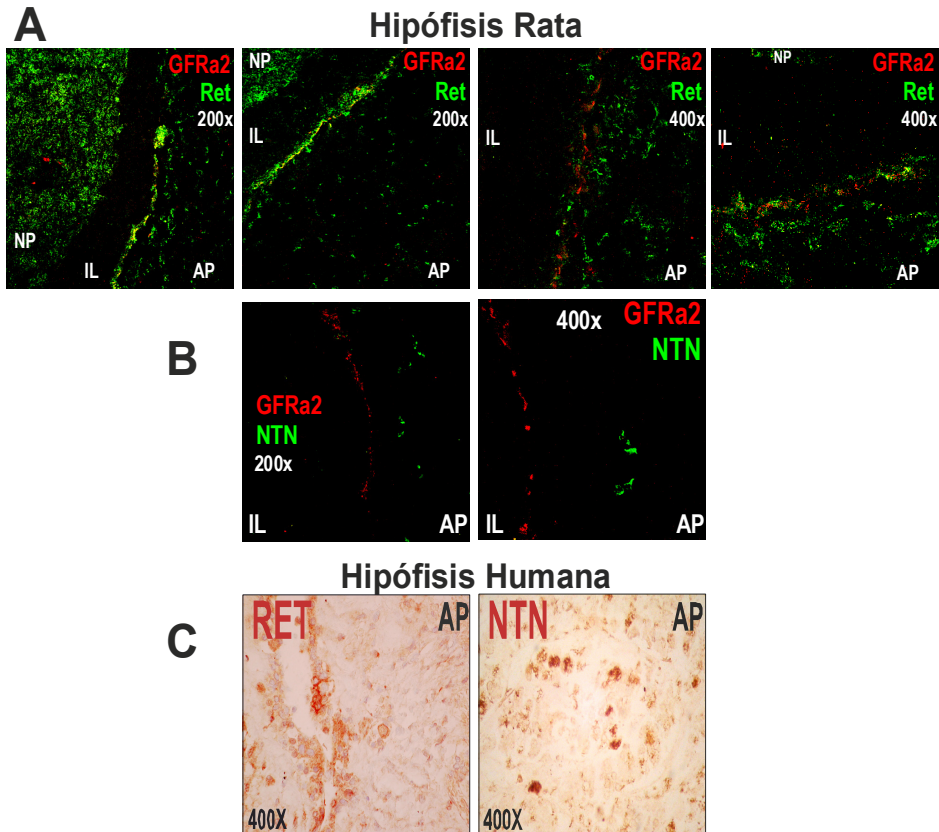


Fig. 3.- Colocalización de los marcadores implicados en la ruta RET/GRFRa2/NTN. **A)** Doble inmunofluorescencia, anti-GFRa2 con anti-Ret en hipófisis de rata. Se observa, que el anticuerpo dirigido contra el receptor Ret tiñe específicamente las células de la AP y se expresa también en neuronas de la NP, aunque también tiñe específicamente células GFRa2+. **B)** Mediante doble inmunofluorescencia en hipófisis de rata, demostramos que el ligando del receptor GFRa2+, neurturina (NTN) se localiza en la AP (adenhipófisis). **C)** Inmunohistoquímica de RET y NTN en humano, donde se observan los mismos resultados en la inmunofluorescencia para rata.

Observamos por Western Blot que los anticuerpos reconocían GFRA2 y NTN tanto en hipófisis de roedores como en hipófisis humana (fig. 4), mostrando una banda intensa de peso molecular correcto.

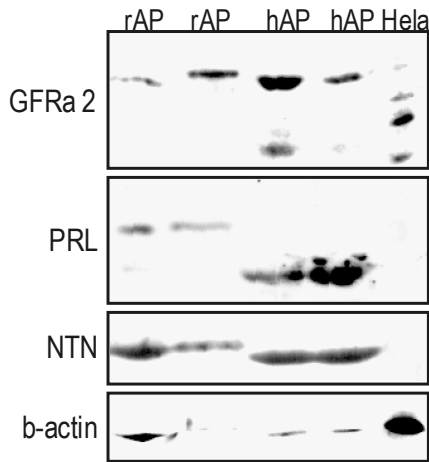


Fig. 4.- **Wester Blot de GFRA2 y su ligando específico Neurturina (NTN).** Western Blot de GFRA2, neurturina (NTN) y prolactina (PRL) en muestras de adenohipófisis de rata (carriles marcados “rAP”) y seres humanos (carriles marcados “hAP”), así como en células HeLa (control positivo humano para GFRA2), utilizando como control de carga β -actina (b-actin). Se observa señal en todos los carriles correspondientes a muestras de adenohipófisis, aunque la prolactina y la neurturina muestran una pequeña diferencia en el peso molecular entre las especies estudiadas.

Nuestro siguiente paso fue caracterizar qué tipo de células de la adenohipófisis eran estas células GFRA2/RET +. Sabíamos que las células somatotropas eran GFRA1/RET+; pero la falta de marcaje de GFRA2 en la adenohipófisis en la figura 3 sugería que las somatotropas eran células GFRA2-/RET+.

La hipófisis tiene seis tipos de células secretoras de hormonas. Realizamos pues, dobles inmunofluorescencias para cada una de ellas y GFRa2. Como se observa en la figura 5, las células GFRa2+, no eran células secretoras de hormonas, debido a que eran absolutamente negativas para las hormonas adenohipofisarias (GH, PRL, ACTH, TSH,FSH y LH).

Se observa la existencia de un límite preciso entre la zona marginal y la adenohipófisis.

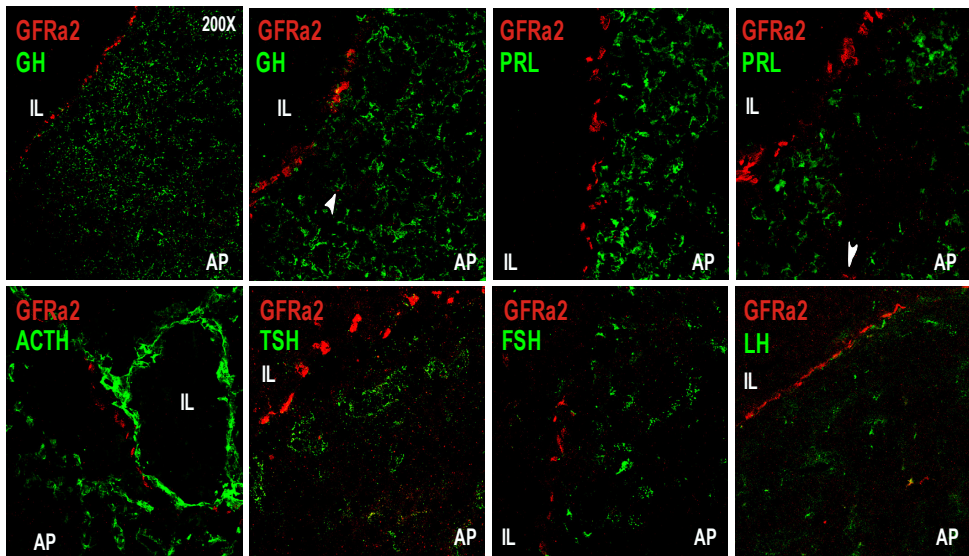


Fig. 5.- Localización de las células GFRa2+ en la zona marginal de la hipófisis adulta de ratas. Doble inmunofluorescencia, anti-GFRa2 con anti-hormonas adenohipofisarias (GH, PRL, ACTH, TSH, FSH y LH). Se observa que GFRa2 (rojo) se dispone en la frontera entre AP e IL, y no colocaliza con ninguna hormona hipofisaria. AP, adenohipófisis, IL, lóbulo intermedio.

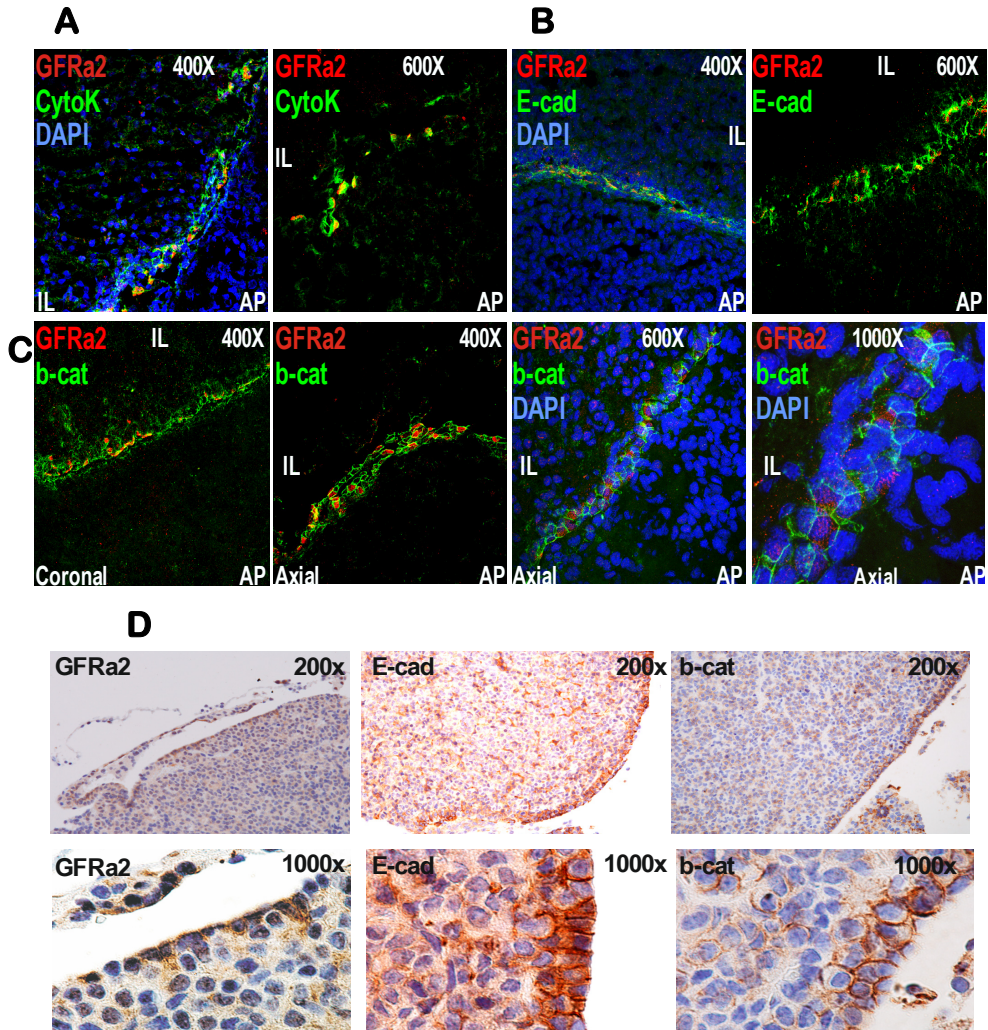


Fig. 6.- Colocalización de las células GFRα2+ con marcadores epiteliales en hipófisis de rata y ratón. Doble inmunofluorescencia, de GFRα2 con marcadores epiteliales en hipófisis de rata. Se demuestra que las células GRFα2+ son epiteliales con expresión incrementada de citoqueratinas (A), E-cadherina (B) y beta-catenina (C) en comparación con las otras células de la AP. C) Se observa la orientación de GRFα2 dentro del nicho, en coronal, aparecen GFRα2 o β-Catenina como una línea delgada o una tinción verde en forma de U, mientras que en axial, GFRα2 aparece como una superficie amplia y b-catenina como un anillo en orientación perpendicular. AP, adenohipófisis, IL, lóbulo intermedio; NP, neurohipófisis. Tinción de núcleos con DAPI. D) En la inmunohistoquímica de ratón se muestra la localización de las células GFRα2 en el mismo sitio que E-Cadherina y β-Catenina. Tinción de núcleos con hematoxilina.

Para intentar estudiar qué tipo de células podían ser, realizamos la doble inmunofluorescencia para filamentos intermedios. El citoesqueleto de las células epiteliales expresa Citoqueratinas como filamentos intermedios (fig. 6 A). Observamos una fuerte sobreexpresión de este marcador por las células GFRA2+, muy por encima de las demás células de la Adenohipófisis (AP) y del lóbulo intermedio (IL), de forma que el microscopio confocal lo consideraba fondo. Lo que demuestra que son células epiteliales. Lo mismo ocurrió cuando se realizó la doble inmunofluorescencia, en hipófisis de rata, e inmunohistoquímica, en hipófisis de ratón, para otros marcadores epiteliales tales como E-cadherina característica de los desmosomas. En la figura 6 B y D podemos observar, tanto en rata como en ratón, la marcadísima tinción de E-cadherina en la línea de células GFRA2+, presentando una expresión aumentada en estas células con respecto a las demás células de la hipófisis.

Unida a la cara citoplasmática de la membrana plasmática se encuentra b-catenina, una proteína relacionada con E-cadherina, que también aumentaba su expresión en las células GFRA2+ (fig. 6 C). Existen muchos trabajos que relacionan la sobreexpresión de los filamentos intermedios, E-cadherina y b-catenina con células madre, ya sea durante el desarrollo embrionario o en células madre adultas. La vía canónica de Wnt/FZ/E-cadherina/ b-catenina es esencial para mantener el balance células madre/progenitoras (divisiones simétricas/asimétricas) de las células madre embrionarias con CBP como co-activador, pero también en el inicio de la morfogénesis del epitelio y el establecimiento de uniones adherentes a través de células progenitoras con menor capacidad proliferativa utilizando p300 como co-activador (Karpowicz et al., 2009; Lai et al., 2009).

Recientemente se ha demostrado que b-catenina no es esencial para la división de las células madre embrionarias sino para la diferenciación inicial en ectodermo (Lyashenko et al., 2011). Más aún, de los dos posibles mecanismos de acción en los que está implicada b-catenina, parece que el más importante en la diferenciación de las células madre embrionarias es el asociado a citoesqueleto y b-catenina (planar polarity) y no la vía de Wnt donde b-catenina se convierte en un factor de transcripción nuclear.

En la figura 6 C se observa un enriquecimiento del marcaje con b-catenina activada en la zona correspondiente a la zona marginal situada entre la adenohipófisis y el lóbulo intermedio que coincidía con las células GFRA2+, aunque situadas en zonas distintas de la célula. GFRA2 se sitúa en la membrana, mientras que b-catenina se localiza en el citoplasma, y ambas eran perpendiculares entre sí (véase las secciones Axiales de 400x y 1000x fig. 6 C) lo que podría sugerir que las células GFRA2+ presentaran una polaridad planar, específica de capas de células epiteliales, para organizarse en una dirección fisiológica.

Pit-1, es un factor de transcripción común en todas las células somatotropas (GH), lactotropas (PRL) y tirotropas (TSH), en conjunto el 80% de las células de la adenohipófisis. Una vez observado que las células GFRA2 y b-catenina eran las mismas, realizamos la doble inmunofluorescencia en hipófisis de rata para Pit-1 (fig. 7 A) y se vio que las células b-catenina+ tampoco coincidían con Pit-1, lo que confirmaba que las células GFRA2+/ b-catenina+ eran células epiteliales no secretoras. También realizamos inmunohistoquímica para GFRA2 y Pit-1 en hipófisis de ratón, y observamos que ambas señales se localizan en zonas fronterizas pero no en el mismo sitio (fig. 7 B).

Para averiguar la proporción de células GFRa2+ de la hipófisis, se realizaron ensayos de análisis por citometría de flujo con una suspensión de células de adenohipófisis de ratón dispersadas enzimáticamente y seleccionadas para GFRa2 (fig. 8). Los resultados muestran que la población de células pequeñas (\uparrow FSC, \downarrow SSC) que presenta la señal FITC más intensa (la representada en la parte derecha de cada uno de los gráficos superiores), supone aproximadamente un 0,9% de la suspensión total de células en las muestras GFRa2+, mientras que en el control, con una Ig de conejo no inmune, dicha población supone menos del 0,1%.

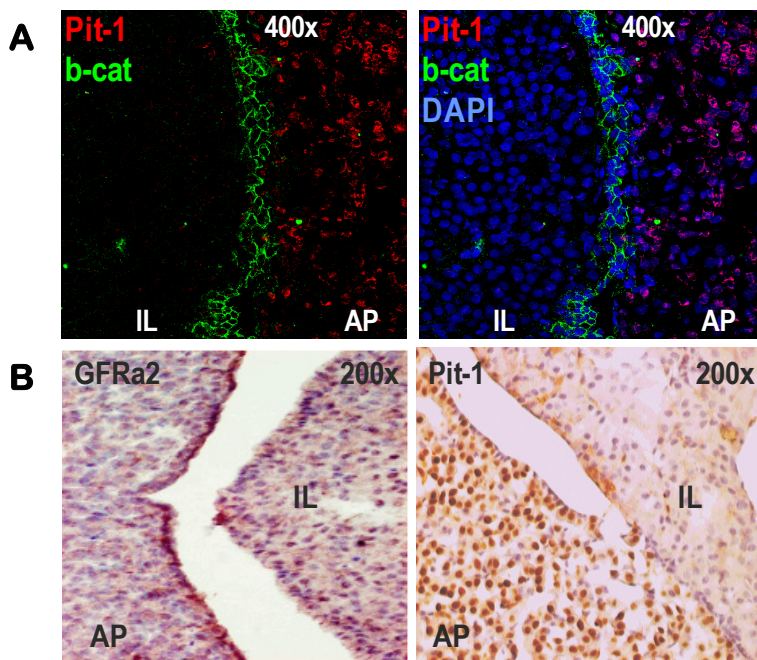


Fig. 7.- Localización de las células b-catenina +/- GFRa2+ y el factor de transcripción Pit-1 en hipófisis de rata y ratón. **A)** Doble inmunofluorescencia, en hipófisis de rata de b-catenina con Pit-1. Se muestra que las células b-catenina+ son negativas para Pit-1. **B)** Inmunohistoquímica en hipófisis de ratón, donde se muestra que GFRa2 y Pit-1 no colocalizan. Tinción de núcleos con hematoxilina. AP, adenohipófisis, IL, lóbulo intermedio; NP, neurohipófisis.

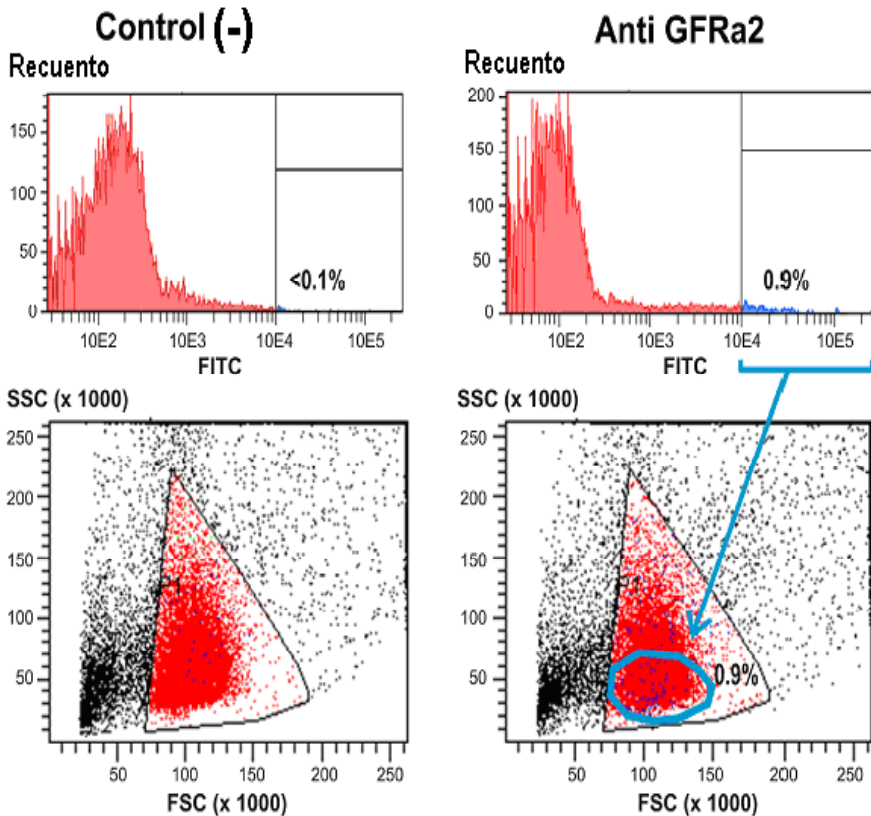


Fig. 8.- **Proporción de células hipofisarias GFRa2+.** Citometría de flujo tras una dispersión celular enzimática de la AP de ratón tratadas con un anticuerpo anti-conejo marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) con una incubación previa con un anticuerpo GFRa2 (gráficos de la derecha) o con una Ig de conejo no inmune (gráficos de la izquierda: control negativo). Los gráficos superiores representan el recuento de células FITC+ con el nivel de señal de fluorescencia indicada en abscisas; los gráficos inferiores son diagramas de puntos en los que se representa, para cada célula, la dispersión frontal (FSC: forward scatter) frente a la lateral (SSC: side scatter). En el gráfico inferior derecho, la zona rodeada con una elipse corresponde a las células GFRa2+ detectadas después de la unión específica al anticuerpo de GFRa2; aproximadamente el 0.9% de las células de la AP corresponden a las células GFRa2+.

4.2.- LAS CÉLULAS GFRa2+ EN ROEDORES Y HUMANOS EXPRESAN FACTORES ESPECÍFICOS DE LA HIPÓFISIS Y MARCADORES DE CÉLULAS MADRE

La expresión tan alta de filamentos intermedios E-cadherina y citoqueratinas, junto a la de b-catenina es característica de células madre adultas en los muchos nichos descubiertos y también durante el desarrollo embrionario (Karpowicz et al., 2009). Decidimos explorar la posibilidad de que las células GFRa2+/ b-catenina+ fueran células madre remanentes de los precursores embrionarios.

Uno de los factores de transcripción esenciales durante el desarrollo embrionario de la hipófisis en el inicio de la bolsa de Rathke es Prop-1. Las mutaciones en este factor causa Deficiencia Combinada de Hormonas Hipofisarias (Combined Pituitary Hormone Deficiency (CPHD)) una enfermedad caracterizada por la ausencia de todas las hormonas excepto en algunas ocasiones la ACTH (Bottner et al., 2004). En la hipófisis adulta normal, se pensaba que Prop-1 no se necesitaba más y estaba completamente apagado después del nacimiento.

Mediante Western blot demostramos que este factor de transcripción específico de la hipófisis Prop1 se expresaba en hipófisis adulta de rata y humano, siendo negativa su expresión en la línea cancerosa humana de células Hela y en una línea celular de rata derivadas de células hipofisarias somatotropas (GH4C1).

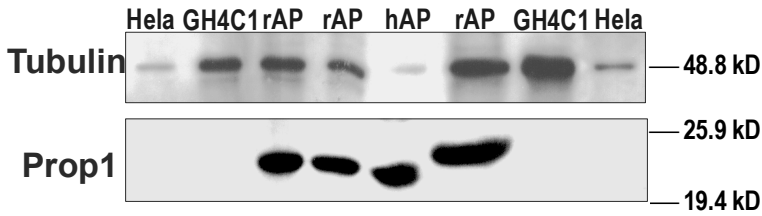


Fig. 9.- Western Blot para Prop-1 en hipófisis de rata y humano. Se muestra, el factor de transcripción específico de hipófisis Prop1 en hipófisis de rata adulta (calles marcadas “rAP”) y humana (calles marcadas “hAP”). Esta proteína está ausente de los restantes carriles: no se expresa en células HeLa o en una línea celular de hipófisis de rata similar a somatotropas (GH4C1). Como control de carga se utilizó alfa-tubulina.

Para verificar la expresión de otros marcadores específicos del desarrollo embrionario de la hipófisis y de células madre/progenitoras por parte de las células GFRa2+ y comprobar el porcentaje de células en las que podía observarse co-expresión de GFRa2+ y otros marcadores, se realizaron ensayos de tinción por inmunofluorescencia con doble marcaje, que se repitieron en hipófisis de animales diferentes (más de 10) y con distintas criosecciones obtenidas de muestras de hipófisis de un mismo animal.

Observamos que en las hipófisis de rata Prop1 se co-expresa en la línea de células que co-expresan GFRa2 y b-catenina (fig. 10). En la mayoría de células GFRa2+, Prop1 se localiza principalmente en el citoplasma, pero en algunas células lo encontramos concentrado en el núcleo. A su vez demostramos que las células marginales expresaban marcadores de células madre, tales como Oct4, Sox2 y Sox9. Curiosamente, todos estos marcadores también co-localizaban con la línea de células GFRa2+/ b-catenina+/ Prop1+ en la zona marginal de la

hipófisis, tanto en rata (fig. 11) como en ratón (fig. 12). Mientras que Sox2 y Sox9 siempre se localizaron en el núcleo, Oct4 se localizaba principalmente en el citoplasma excepto en algunas células aisladas que se localiza nuclear.

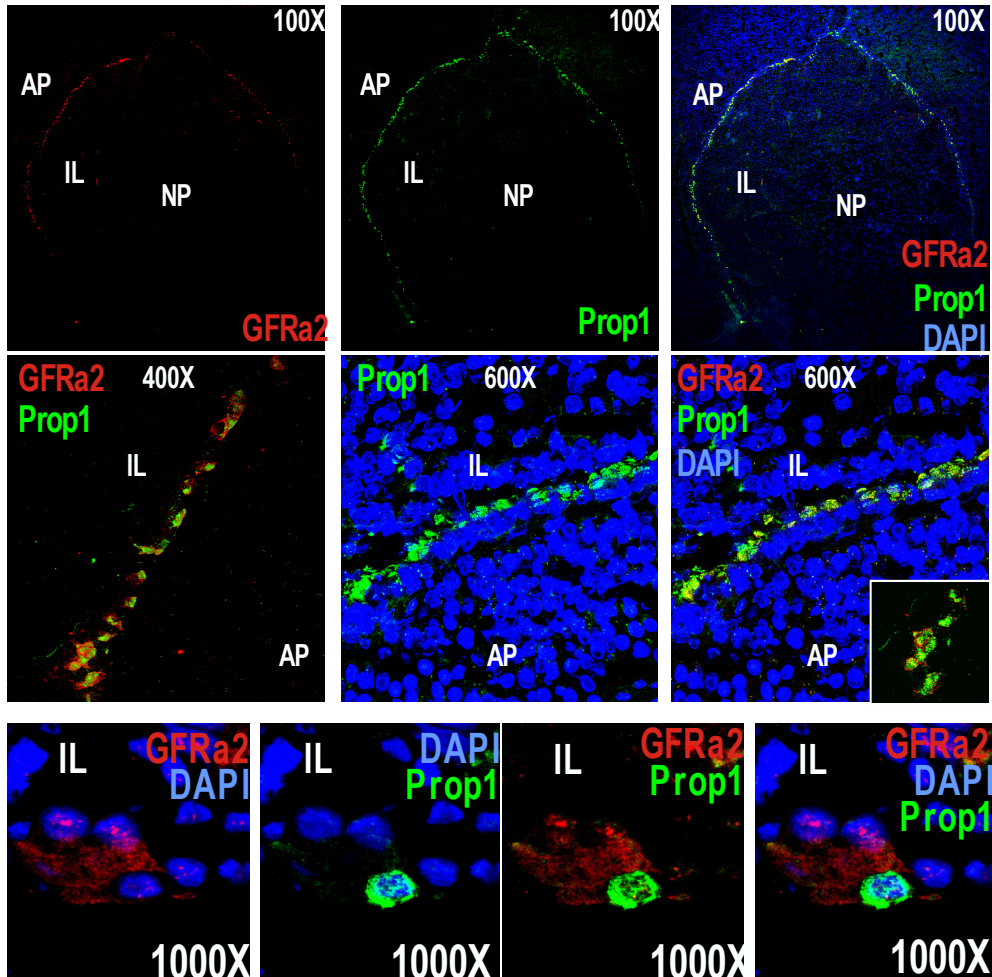


Fig. 10.- Colocalización de Prop-1 con las células GFRa2⁺ en hipófisis de rata. Inmunofluorescencia anti-GFRa2⁺ y anti-Prop1 realizadas en hipófisis de rata. Se observa la colocalización de las señales indicativas de la presencia de GFRa2 y Prop1 en la zona marginal entre la AP y el IL. Se aprecia que los núcleos positivos para Prop1 están rodeados por la tinción de membrana de GFRa2.

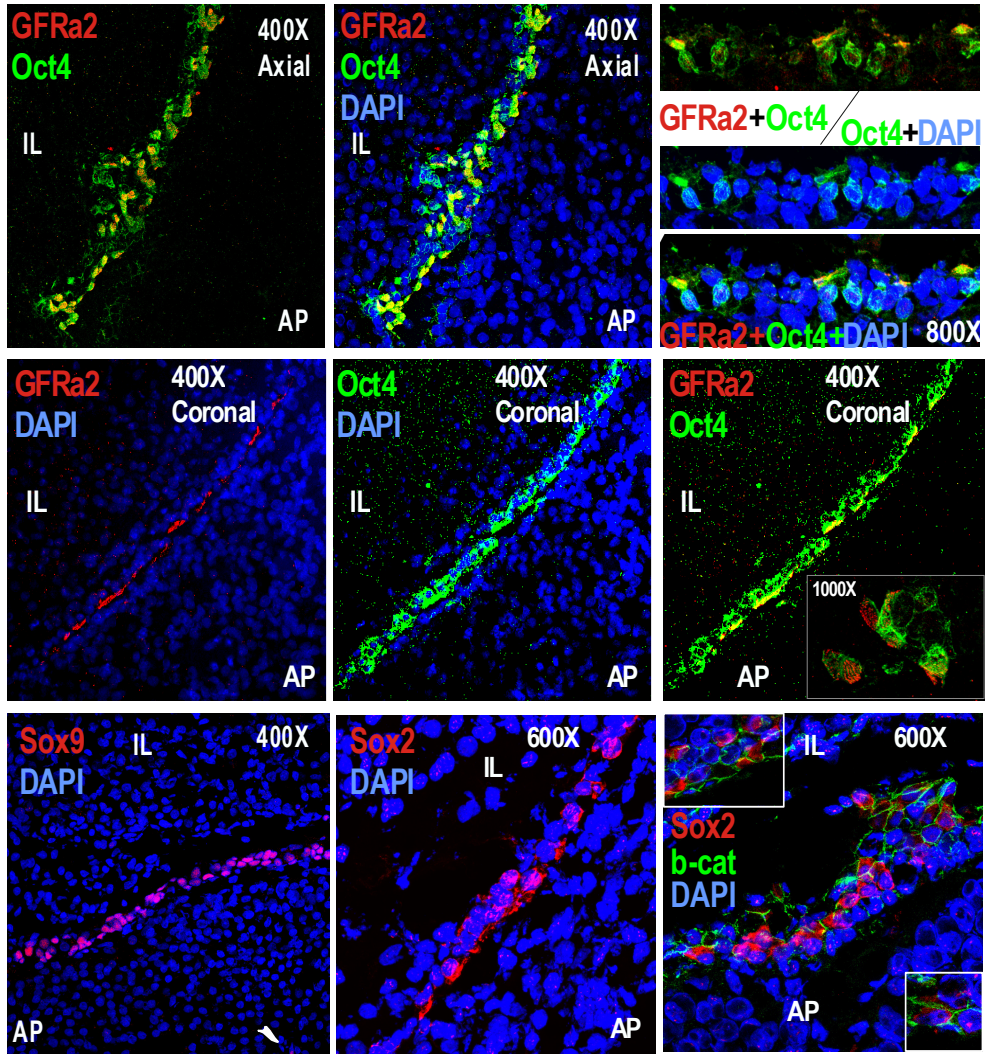


Fig. 11.- Colocalización de los marcadores Stem Cells Sox2, Oct4 y Sox9 con las células GFRa2+ en hipófisis de rata. Doble inmunofluorescencia anti-GFRa2 o b-catenina con anti-Oct4 o Sox2. Se observa la co-localización de las señales de GFRa2 y Oct4, así como b-catenina y Sox2 en la zona marginal entre la AP y el IL, localizándose en esta misma zona los núcleos positivos para Sox9. AP, adenohipófisis, IL, lóbulo intermedio; NP, neurohipófisis, núcleos; DAPI.

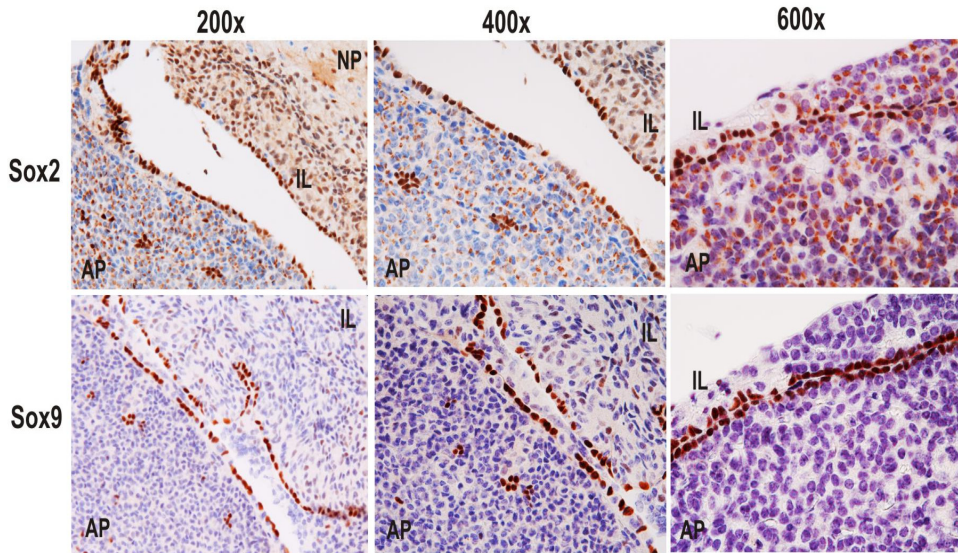


Fig. 12.- **Localización de marcadores Stem Cells con las células GFRA2+ en hipófisis de ratón.** Las secciones de parafina de hipófisis de ratón muestran en aumentos crecientes la localización de las células positivas para Sox2 y Sox9. Tinción de núcleos con hematoxilina

En la hipófisis humana normal pudimos ver que las células GFRA2+, se situaban rodeando los quistes de Rathke en la zona marginal entre la adenohipófisis y la neurohipófisis, y también eran positivas para todos los marcadores de células madre utilizados en nuestro estudio, OCT4, SOX2 y SOX9 (fig. 13).

Dado que las células GFRA2+ expresan factores específicos de la hipófisis de relevancia fisiológica clara tales como Prop1, y marcadores fiables de células madre/progenitoras de la familia Sox/Oct, denominados a estas células de forma abreviada: como células GFRA2+, Prop1+, Stem+ (GPS).

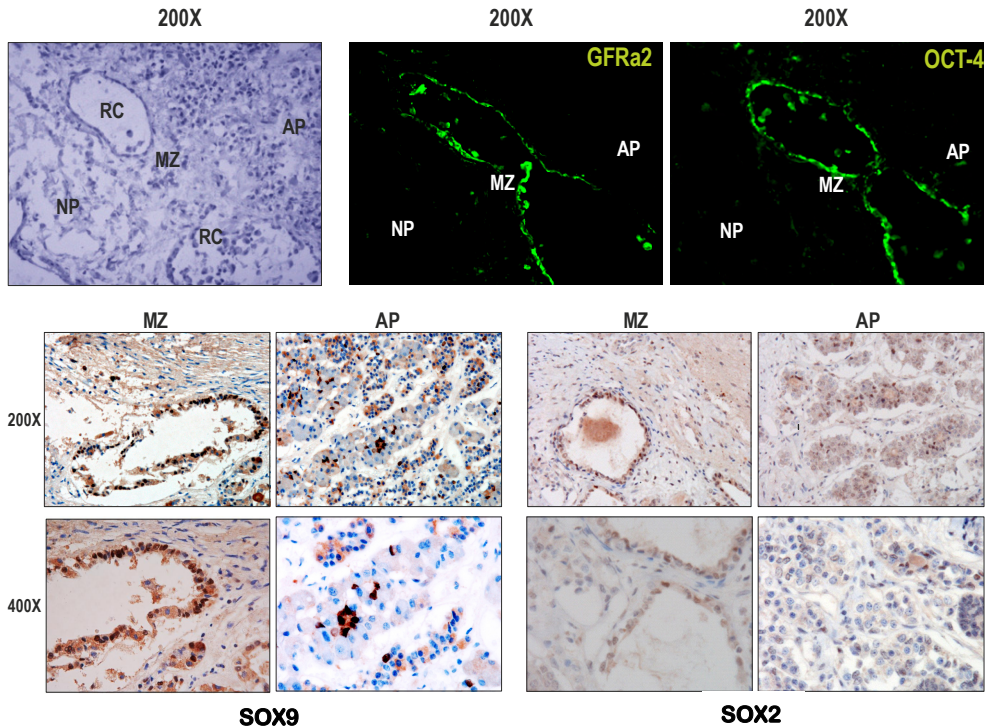


Fig. 13.- Expresión de marcadores Stem Cells en la zona marginal (MZ) de la hipófisis humana. La inmunofluorescencia con el anticuerpo GFRa2 y OCT4 demuestra que las células que bordean los quistes de Rathke expresan GFRa2 y OCT4. Las secciones de parafina conteniendo la zona marginal (MZ) o correspondientes a la adenohipófisis humana (AP) demuestran que esas mismas células de la MZ expresan SOX9 y SOX2.

Luego encontramos que estas células GPS eran positivas para otros marcadores de células madre embrionarias tales como KLF4 y SSEA-4 y negativas para Nanog (fig. 14). Nuestras células también eran positivas para GFRa3 (fig. 15), otro co-receptor perteneciente a los co-receptores alpha de GDNF y negativas para Nestin (fig. 16) un marcador de células folículoesteladas (Krylyshkina et al., 2005). Nestin ha sido el marcador más ampliamente utilizado para identificar las células madre del SNC tanto en el sistema nervioso en desarrollo, como en las células cultivadas en vitro. Pero también se ha descubierto

Nestin en poblaciones de células madre no neuronales, como en los islotes pancreáticos y en células madre de la médula ósea, donde se distinguen dos poblaciones de células madre, las células madre mesenquimales (MSC, Nestin+) y las células madre Hematopoyéticas (HSC, Nestin-) que forman un único nicho (Mendez-Ferrer et al., 2010). En nuestras muestras observamos que Nestin se expresa en células aisladas de los tres lóbulos de la hipófisis pero no co-localiza con la tinción para GFRA2.

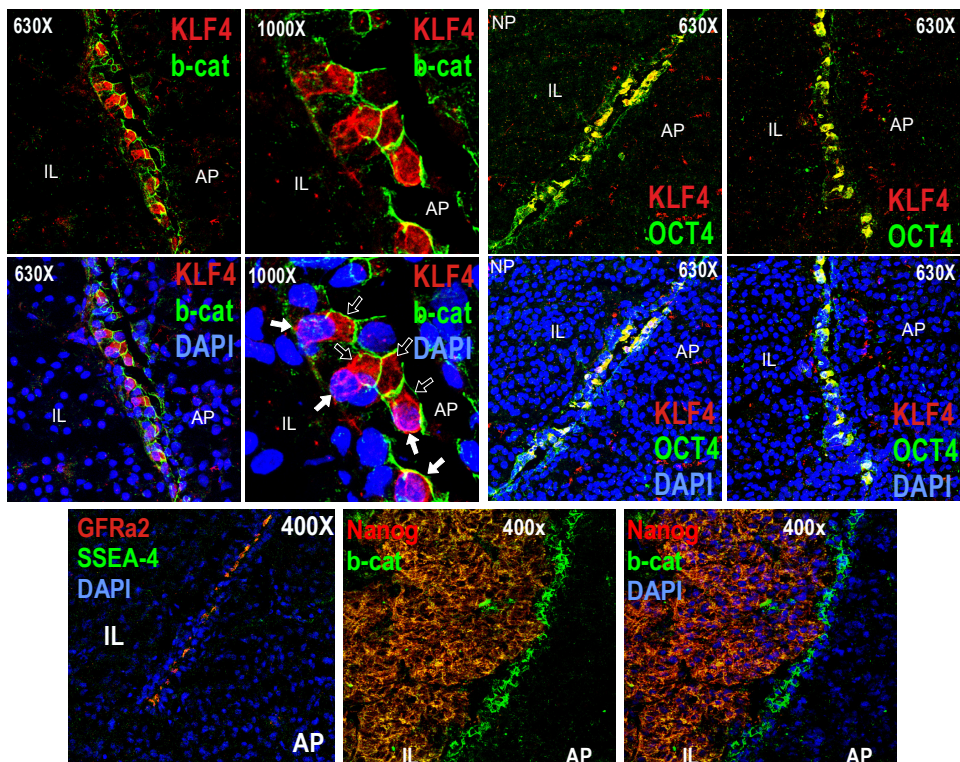


Fig. 14.- Colocalización de los marcadores de células madre KLF4, SSEA4 y Nanog con las células GPS en hipófisis de rata adulta. La inmunofluorescencia con el anticuerpo KLF4 muestra su colocalización con b-catenina y OCT4, expresados por las células GPS en la hipófisis. La doble inmunofluorescencia de GFRA2 y SSEA4 muestra la colocalización de ambas señales. No ocurre lo mismo con la doble inmunofluorescencia de b-Catenina y Nanog, donde se observa la expresión de Nanog en el lóbulo intermedio y no se solapa con la de b-catenina que es la proteína que expresan las células GFRA2+. AP, adenohipófisis, IL, lóbulo intermedio; NP, neurohipófisis. Tinción de núcleos con DAPI.

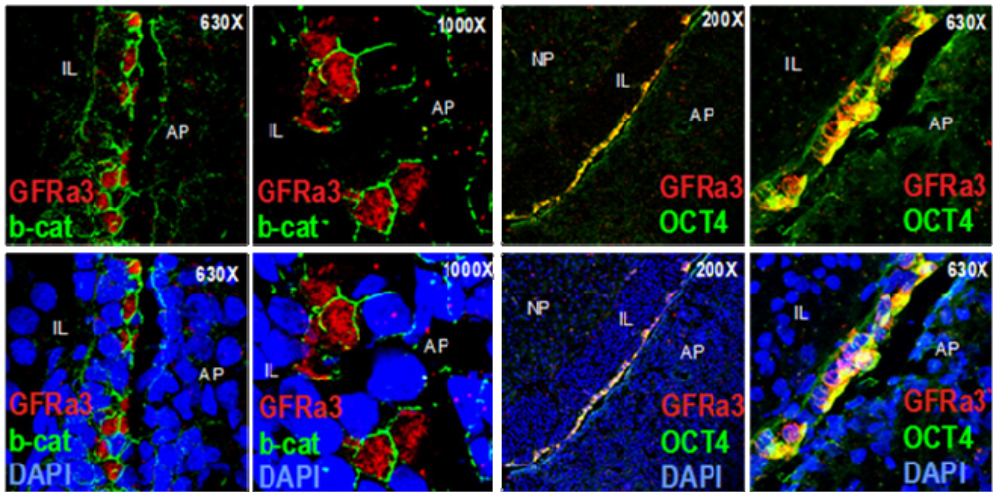


Fig. 15.- Colocalización de GFRa3 con las células GPS de hipófisis de rata adulta. La inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-GFRa3 muestra su colocalización con b-Catenina y OCT4, expresados por las células GPS en la hipófisis. AP, adenohipófisis, IL, lóbulo intermedio; NP, neurohipófisis. Tinción de núcleos con DAPI.

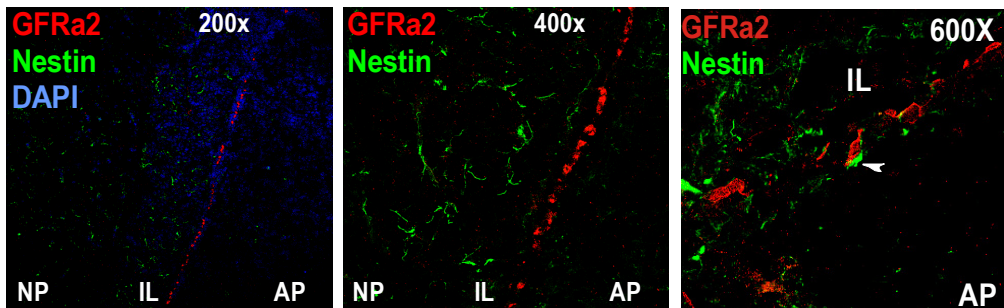


Fig. 16.-Ausencia de colocalización de Nestin con las células GPS de hipófisis de rata adulta. En la doble inmunofluorescencia con los anticuerpos GFRa2 y Nestin, se observa que las células positivas para nestin están dispersas en el IL y en la AP y no coinciden con las células GFRa2+. La neurohipófisis es positiva, como se esperaba ya que se expresa en neuronas, sin embargo, existen estructuras finas similares a axones que vienen de la NP y que entran en contacto con las células GFRa2+ (flechas blancas). AP, adenohipófisis, IL, lóbulo intermedio; NP, neurohipófisis. Tinción de núcleos con DAPI.

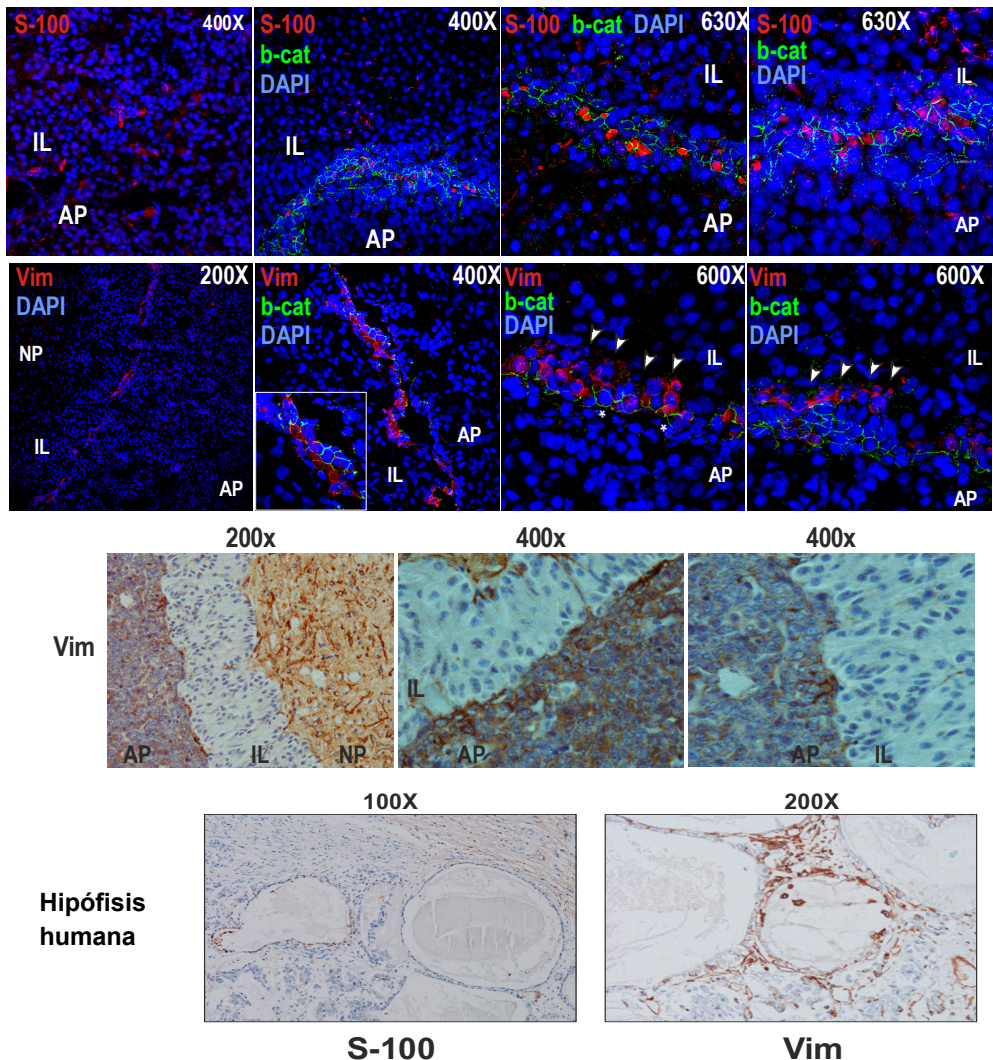


Fig. 17.- Colocalización o ausencia de distintos marcadores de células foliculo esteladas en hipófisis de rata, ratón y humano. La inmunofluorescencia, en hipófisis de rata de S-100 y b-catenina muestra que alrededor de la mitad de las células GFRA2/b-catenina+ muestran señal para S-100. En la expresión de vimentina se observa, mediante inmunofluorescencia en hipófisis de rata e inmunohistoquímica en hipófisis de ratón, que la vimentina se expresa en una línea de células vecina a las células β -catenina/GFRA2+ y paralelas a las mismas, situadas más próximas al IL; la fijación provoca en algunas ocasiones la individualización de las dos líneas de células. En la hipófisis humana la inmunohistoquímica muestra un patrón de tinción similar, S-100 bordea los quistes de Rathke, mientras que las células alargadas vimentina+ rodean periféricamente el epitelio de células GFRA2+. AP, adenohipófisis, IL, lóbulo intermedio; NP, neurohipófisis. Tinción de núcleos con DAPI.

Por otra parte, encontramos una intensa positividad para el marcador de células folículoesteladas S-100 (Krylyshkina et al., 2005) y para el marcador de células madres mesenquimales Vimentina, que es característico de los filamentos intermedios del estroma dentro de los nichos de células madre (Kasper and Karsten, 1988; Marin et al., 1989). Vimentina se expresa en la misma zona que las células GFRA2+. Encontramos vimentina en una línea de células próximas al lóbulo intermedio, paralela a la línea de células GFRA2+, tanto en hipófisis de ratón como en hipófisis de rata. En la figura 17 se observa en la doble inmunofluorescencia con b-Catenina que no co-localizan, porque muchas veces podemos separar las dos líneas de células. Estos mismos resultados se encontraron también en hipófisis humana (fig. 17).

Todos estos resultados repetidos en muchos animales nos permiten cuantificar el porcentaje relativo de todos los marcadores estudiados en este trabajo (tabla 1). Las células GFRA2+ co-expresan diversos marcadores de células madre/progenitoras (OCT4, SOX2, SOX9, PROP-1, SSEA4, KLF4) siendo en todos los casos el porcentaje de coincidencia mayor del 90%. En la tabla 1 también se muestra, que el porcentaje de coincidencia de las células GFRA2+ con marcadores epiteliales de la ruta de Wnt, está entre el 85% y el 90%. Sin embargo, las células GFRA2+ son negativas para otros marcadores de células madre como Nestin o Nanog, así como para el factor de transcripción Pit-1 y las seis hormonas producidas por la hipófisis, donde el porcentaje de coincidencia es del 0%. También se observó el porcentaje de expresión de RET-L, menos intenso que en células somatotropas, del 78% y una expresión del co-receptor GFRA3 del 95%. De las células GFRA2+ aproximadamente el 40% son S100+.

Todos estos resultados nos permiten proponer la existencia de un nicho de células GPS (G: GFRA2+; P: Prop1+; S: Stem+, Oct4, Sox2, Sox9) en la zona marginal de la hipófisis de roedores y humanos.

Tabla 1.- Marcadores expresados o ausentes de células GFRA2+

MARCADOR	% de células GFRA2+ que contienen el marcador*
Hormonas	
GH	0%
ACTH	0%
PRL	0%
TSH	0%
FSH	0%
LH	0%
Ruta de GFRA2/RET	
Ret	78 %
Pit-1	0 %
GFRA3	95%
Marcadores epiteliales y ruta de Wnt	
Multi-citoqueratina	90%
E-cadherina	86%
b-catenina-activada	91%
Marcadores de células madre	
SSEA4	100 %
Prop1	99 %
Oct4	94 %
Sox2	91 %
Sox9	96 %
KLF4	98%
Nestin	0%
Nanog	0 %
Otros marcadores	
S-100	43%

* Para cada combinación de marcadores se contaron 125-200 células.

4.3.- PURIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS GFRa2+

Una vez caracterizadas las células GPS nos propusimos purificarlas y crecerlas en un medio libre de suero. Para ello se estandarizó un protocolo de purificación de células GFRa2+ por medios magnéticos (materiales y métodos 3.8). Un esquema del método de aislamiento de células GRF2+ mediante la aplicación de la metodología MACS se representa en la figura 18: En las primeras fases las células de la hipófisis fueron dispersadas con tripsina. Pero estas células tras el aislamiento con MACS, al ser cultivadas en medio libre de suero (SpherM), no formaban esferoides. Esto nos llevó a pensar, que las células dispersadas con tripsina perdían el receptor GFRa2, debido posiblemente a que los receptores GFRa son proteínas extracelulares unidas covalentemente a la membrana plasmática a través de un anclaje GPI de glicosilfosfatidil-inositol sensible al tratamiento con tripsina.

A continuación, probamos a dispersar las células con Colagenasa IA y DNasa I. Las células dispersas con estas dos enzimas fueron incubadas con un anticuerpo anti-GFRa2 de conejo y posteriormente incubadas con un anticuerpo anti-conejo acoplado a partículas magnéticas (MACS). A continuación se eluyeron las células por una columna acoplada a un imán, el cual, nos permitió obtener dos fracciones de celulares: las células retenidas en la columna, células GFRa2+, y las células excluidas, no retenidas, las células GFRa2-.

Una vez aisladas, las células se mantuvieron en cultivo en suspensión en un medio específico libre de suero SpherM (materiales y métodos 3.8 tabla5). Se utilizaron placas de 35 cm de diámetro, en cada una de las cuales se sembraron 2500 células, tanto de las células GFRa2+ como de las células GFRa2-. Mediante

la técnica de inmunofluorescencia se observo que el porcentaje de purificación obtenido con el método de cultivo era de un 90% para las células GFRa2+, frente a 5% de células GFRa2+ en la fracción de células excluidas, GFRa2- (fig.18).

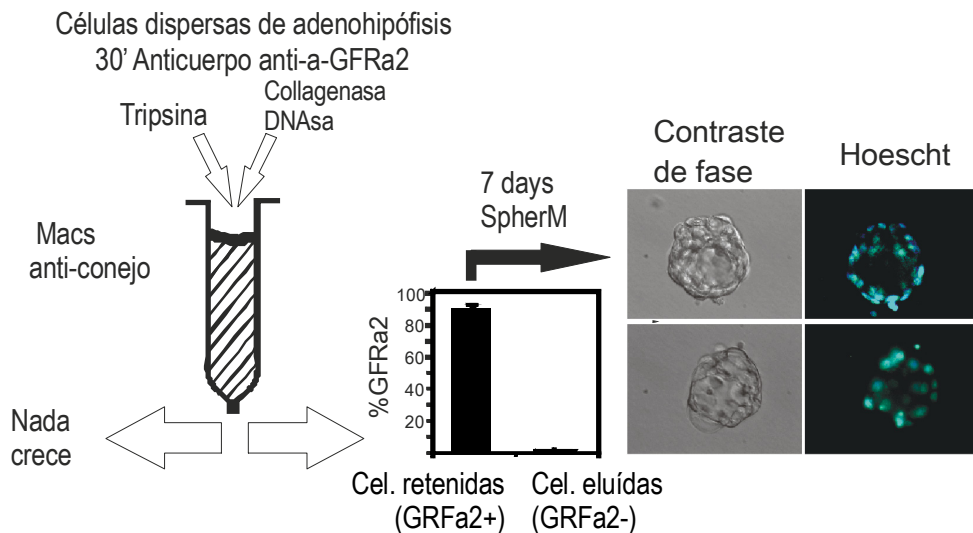


Fig.18.-**Esquema del método de aislamiento de células GFRa2+.** Se recurre a la dispersión con collagenasa (la dispersión con tripsina no da lugar a crecimiento celular), incubación con un anticuerpo anti-GFRa2 de conejo, incubación con un anticuerpo anti-conejo acoplado a partículas magnéticas (Macs), que son retenidas por la columna acoplada a un imán. Una vez eluidas, las células se mantienen en un medio libre de suero (SpherM) de 1 a 7 días, dando lugar a esferoides. En la parte derecha de la figura se muestran varias fotografías de tinción con Hoechst obtenidas con un microscopio de contraste de fase de algunos de estos esferoides in vivo.

Después de tres a siete días, las células GFRa2+ formaron estructuras esféricas compactas o huecas, con una cavidad rodeada de pequeñas células (139 esferoides/placa, aproximadamente 40 células/esferoide). Algunos de los esferoides formados contenían cilios y mostraban movimientos activos en el plato de cultivo (fig.19). Mientras, las placas en las que se habían cultivado células

GFRa2- presentaban sólo unos pocos acúmulos compactos de células (12 acúmulos/placa, 4-8 células/acúmulo). En las placas pudimos teñir con Hoescht los esferoides vivos y observarlos por microscopia Nomarski y de fluorescencia. Pero la tinción con Hoescht 33258 siempre era muy suave, confirmando de nuevo otra propiedad de las células madre: el rechazo activo de colorantes nucleares vitales.

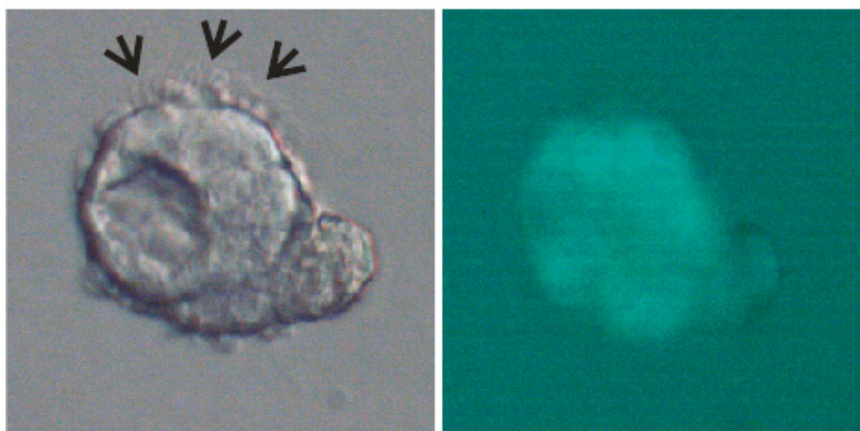


Fig.19.- **Fotografía de un esferoide con cilios.** Fotografía representativa de los esferoides que presentaban cilios después de 3 a 7 días de cultivo SpherM. En la fotografía de la izquierda las flechas negras sobre los bordes del esferoide indican la presencia de cilios. En la fotografía de la derecha se muestra la suave tinción con Hoechst 33258 obtenida con un microscopio de contraste de fase del esferoide in vivo.

Demostramos la generación “de novo” de los esferoides mediante ensayos de incorporación de BrdU (fig. 20) que descartaban que fuesen simples acúmulos celulares y, muestran que existía proliferación “de novo” dentro de los esferoides, tanto a los 3 días de cultivo como a los 7 días. Por el contrario, la fracción de células negativas respecto a GFRa2+ mantenida en paralelo, permaneció en forma

de células aisladas con excepción de unos pocos acúmulos de 4-8 células y la tinción negativa para BrdU mostraba que no se multiplicaban.

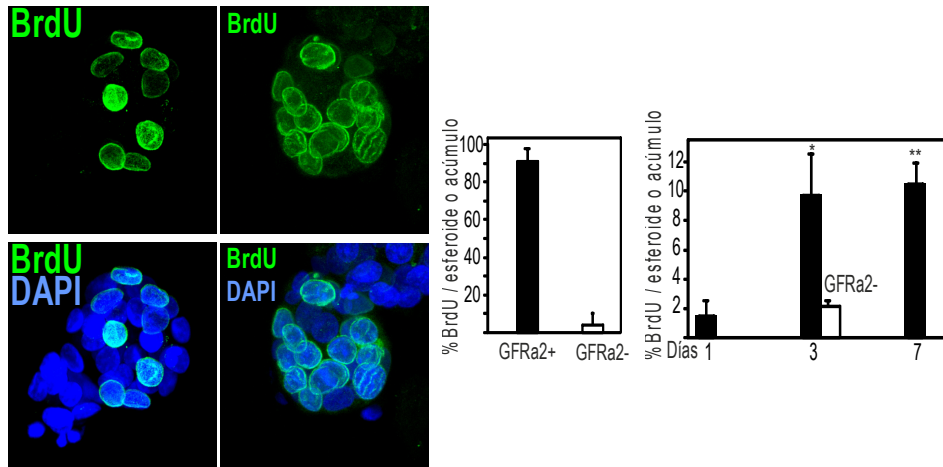


Fig. 20.- Esferoides obtenidos al incubar las células GFRa2+ en medio de cultivo SpherM. Se muestra la incorporación de BrdU por parte de los esferoides en la fotografía de la inmunofluorescencia realizada a los 7 días de cultivo a partir de células aisladas. Los esferoides se incubaron con BrdU 12 horas antes de su fijación. La primera gráfica indica el porcentaje de incorporación de BrdU por esferoide, tanto para células GFRa2+ (barras negras) como para células GFRa2- (barras blancas). El segundo gráfico, indica el porcentaje de incorporación de BrdU para los mismos tipos de células según los días de cultivo (1, 3 ó 7 días). Con ello se demuestra la existencia de proliferación “de novo” dentro de los esferoides formados a partir de células GFRa2+, en contraposición a lo que sucede con las células GFRa2-.

En estos esferoides estudiamos los marcadores característicos de las células GPS y de diferenciación. Los esferoides mantenían la expresión de GFRa2 y, además, mostraban una tinción positiva para Prop1 y b-catenina; también mantenían la expresión de Oct4 y E-cadherina (fig. 21). Además, en estas condiciones de cultivo, estas células seguían siendo negativas para las hormonas hipofisarias (fig. 21).

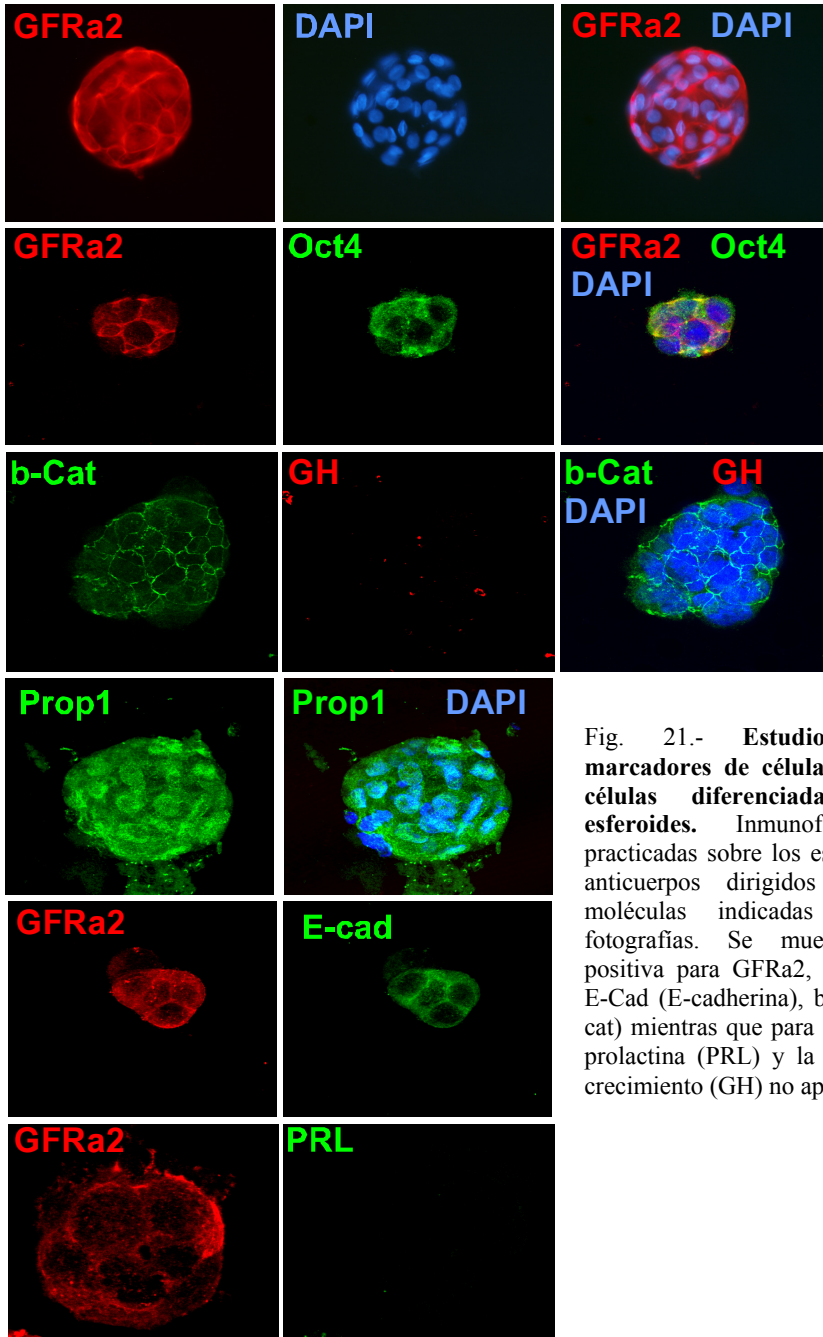


Fig. 21.- Estudio de los marcadores de células GPS y de células diferenciadas en los esferoides. Inmunofluorescencias practicadas sobre los esferoides con anticuerpos dirigidos contra las moléculas indicadas sobre las fotografías. Se muestra tinción positiva para GFRa2, Prop1, Oct4, E-Cad (E-cadherina), b-catenina (b-cat) mientras que para las hormonas prolactina (PRL) y la hormona del crecimiento (GH) no aparece señal.

La localización nuclear de Prop1, así la presencia de Oct4 nuclear en la mitad de las células del esferoide, nos hace especular sobre el papel que estos dos marcadores podrían ejercer sobre el control de la proliferación de las células madre. Puesto que estos dos marcadores “in vivo”, cuando las células madre no se dividen tan activamente, se encuentran situados mayoritariamente en el citoplasma, nos hace suponer que ambos marcadores podrían regular el balance de divisiones simétricas y asimétricas (diferenciación) de las células madre, en el momento que fuese necesario.

A continuación para demostrar que los esferoides se formaban a partir de una única célula madre y que eran generadas “de novo” a partir de ésta, se sembraron diluciones seriadas de células purificadas GFRa2+, en un multiwell de 24 pocillos, hasta obtener una célula por pocillo. Se partió de 18 células por pocillo y mediante una dilución 1:2 se llegó a menos de una célula por pocillo. Los resultados obtenidos muestran que una única célula es capaz de dar origen a un esferoide completo de forma activa y que no proceden de acúmulos celulares (fig. 22).

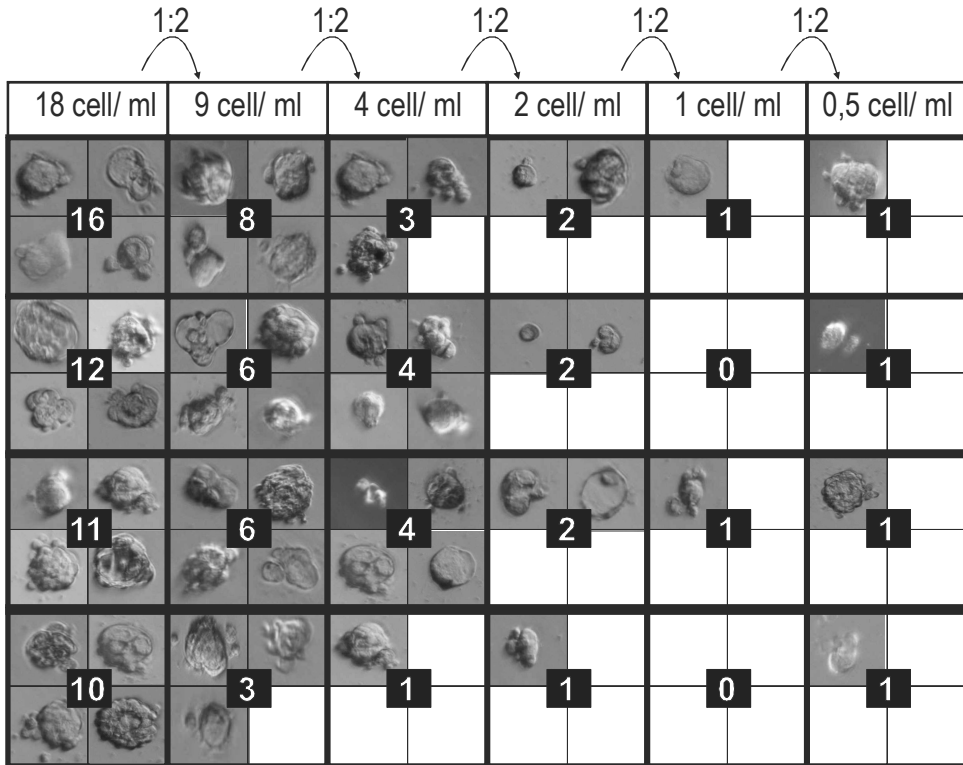


Fig. 22.- Esferoides obtenidos al incubar diluciones seriadas de las células GFRa2+ en medio de cultivo SpherM. Las fotografías de contraste de fase muestran que los esferoides se forman a partir de una única célula y no a partir de acúmulos celulares.

También quisimos comprobar si el ligando de GFRa2, Neurturina (NTN) realizaba algún efecto sobre la proliferación de las células GFRa2+ como esferoides. Observamos que cuando las células se cultivaban en condiciones subóptimas (SpherM diluido a la mitad: 0.5x N2 y B27) la presencia del ligando de GFRa2, Neurturina (NTN), a una concentración de 40 ng/ml, tenía un efecto trófico sobre el número de esferoides y observándose un incremento a los 3 días y

a los 7 días de cultivo, entre 1.5 y 2 veces respectivamente (fig. 23). A la vista de estos resultados podemos decir que NTN actuaba como un promotor fisiológico de la formación de esferoides, lo que indicaba una dependencia parcial del ligando y una función significativa de la ruta NTN/Ret/GFRa2 en las células GFRa2+.

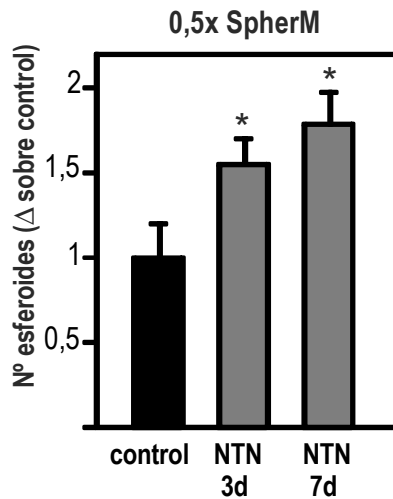


Fig. 23.- **Incremento del número de esferoides cultivados en presencia de Neurturina (NTN).** La gráfica representa el número de esferoides cuando las células se cultivan en condiciones subóptimas SpherM diluido a la mitad: 0.5x SpherM (0,5x N2 y B27), en ausencia (control) o en presencia de 40 ng/ml de neurturina (NTN). Tanto a los 3 días de cultivo (barra NTN 3d) como tras 7 días de cultivo (barra NTN 7d) el número de esferoides es superior en presencia de neurturina sobre el control, indicando que NTN funciona como un promotor fisiológico de la formación de esferoides.

4.4.- LOS ESFEROIDES GFRA2+ SON CAPACES DE DIFERENCIARSE EN CÉLULAS PRODUCTORAS DE HORMONAS

Las células madre son capaces de dividirse simétricamente dando lugar a otras células madre, y asimétricamente originando células diferenciadas.

Se comprobó si las células GFRA2+ de los esferoides mantenían la capacidad de originar células endocrinas. Los esferoides se incubaron en condiciones de diferenciación (materiales y métodos 3.11): Primero los aislamos por pipeteo, ayudándonos del microscopio de contraste de fases, a continuación los sembramos en pocillos / portaobjetos recubiertos de Colágeno Tipo IV (el colágeno característico de las membranas basales de las capas epiteliales) o Polilisisina. Tras inducir la adhesión con suero durante un día, se produjo la incubación en cada uno de los medios de diferenciación DifM 1 al 5 cuya composición está detallada en materiales y métodos (Tabla 7). Esos medios contenían distintas mezclas de hormonas y factores hipotalámicos. Esta estrategia permitió que las células perdieran la expresión de marcadores de células madre, ya que no se observó que ninguna célula fuera positiva para GFRA2 o Prop-1 y fueran inducidas a diferenciarse en cada uno de los seis tipos de células secretoras de la adenohipófisis productoras de hormonas (GH, PRL, TSH, ACTH y FSH).

En las inmunofluorescencias de la figura 24 se muestran los marcadores observados en las células diferenciadas usando los distintos protocolos de diferenciación, que se muestran cuantificados en la Tabla 2.

Tabla 2.- Marcadores detectados con los medios de diferenciación DifM 1-5

	GH		PRL		bTSH		ACTH		bFSH		Tub b III		NeuroF	
	n°+	núcleos	n°+	núcleos	n°+	núcleos	n°+	núcleos	n°+	núcleos	n°+	núcleos	n°+	núcleos
DifM1	n.d.		n.d.		0	10	9 10	38 18	n.d.		n.d.		n.d.	
DifM2	<u>1(1)</u> <u>1(1)</u> 8(0) <u>3(2)</u>	25 52 27 58	0 0	17 17	6(0) 7(0)	29 9	0(0) <u>12(1)</u> 0(0)	29 52 9	<u>5(1)</u> 0(0) <u>2(2)</u>	25 27 58	n.d.		n.d.	
DifM3	0(0) 0(b) 0	17 18 13	6(0) 6(a) 2(a)	1 51 3	0	15	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
DifM4 poli-lisina	<u>6(5)</u> 3(0) 7(0) 0(0) 117 0(0) 0(0)	93 9 37 37 50 25	0	18	7(0) <u>26(0)</u>	28 27	n.d.		n.d.		5 0(0) <u>1(0)</u> 0(0) 2(0) 24(0)	15 28 27 37 117 25	<u>10(5)</u> 0(0) 1(0)	93 9 50
DifM5	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		2	31				

(a) Pocillos en los que se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para GFRa2 (con resultado negativo)

(b) Pocillos en los que se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para Prop1 (con resultado negativo)

() Pocillos en los que se llevaron a cabo ensayos de dobleinmunofluorescencia indicando entre paréntesis el número de células positivas para el marcador adicional analizado.

— Pocillos en los que se llevaron a cabo ensayos de dobleinmunofluorescencia y se detectaron distintos tipos celulares.

n.d.: Ningún dato (ensayos no realizados).

Los resultados obtenidos muestran que usando como sustrato Colágeno Tipo IV y el medio DifM1 una mezcla 1:1 de medio condicionado GH4C1+SSM, que contiene: Apo-Trasferrina, Hidrocortisona, Glucagón, T3, EGF y FGF se obtienen células productoras de ACTH pero no de TSH.

Con el medio DifM 2 ((DMEM/HAMF12 (1:1) + medio condicionado GH4C1 y N2 compuesto por Insulina bovina, transferrina humana, putrescina y progesterona)) se obtienen células de GH, ACTH, TSH y FSH pero nunca células lactotropas, productoras de PRL.

Con el medio DifM3 (medio semisintético (SSM) y N2) se obtienen células productoras de prolactina, pero no de GH y TSH.

Con el medio DifM4 (B27, FGF, GHRH, Grelin, Apo-Trasferrina, Hidrocortisona, Somatostatina e Insulina) usando como sustrato Poli-L-lisina, se obtuvimos células de GH y TSH pero no de prolactina y sorprendentemente, se obtuvimos células con aspecto de neuronas y con apariencia bipolar que eran positivas para una proteína característica de los filamentos intermedios neuronales, neurofilamento (NF), y negativas para GH (fig. 24). También encontramos células positivas para la proteína beta-tubulina III, que es característica de tejido nervioso (fig. 24).

Con el medio DifM5 (medio condicionado GH3+SSM) obtuvimos células de FSH.

Estos resultados sugieren un potencial de células madre ectodérmicas, para las células hipofisarias GFRa2+.

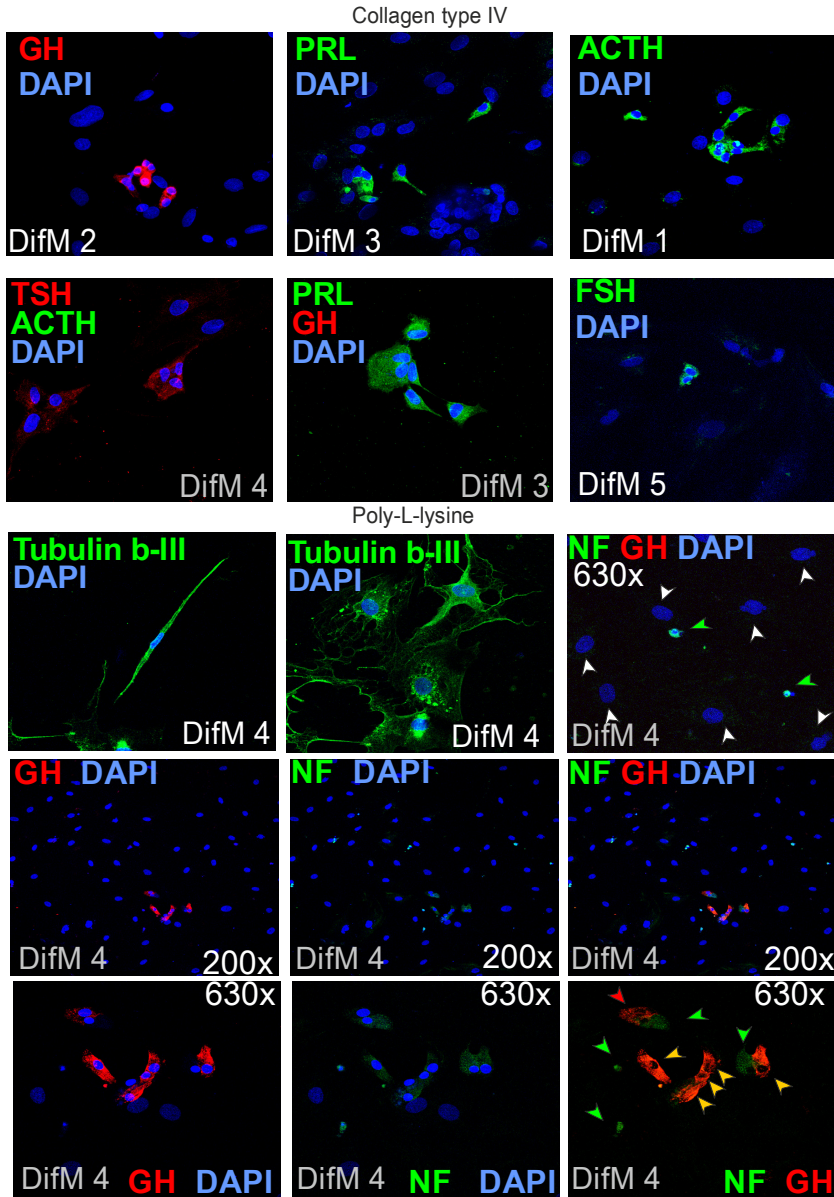


Fig. 24.- **Diferenciación de esferoides a distintos tipos de células de ectodermo anterior.** Fotografías de ensayos de inmunofluorescencias realizadas con distintos anticuerpos, sobre células diferenciadas a partir de esferoides. En cada fotografía se indica el anticuerpo utilizado, así como el medio de cultivo y el tipo de sustrato utilizado para inducir la diferenciación. En la última fotografía (tinción doble NF y GH, a 630 aumentos), se han colocado puntas de flecha que indican los lugares de señal (roja o verde) y colocalización (amarilla) para NF y GH.

Quisimos evaluar la expresión de RNA a lo largo de proceso de diferenciación, para ello se llevó a cabo un análisis por RT-PCR de la fracción GFRa2+ (90% de pureza) y la fracción GFRa2- (95% de pureza) inmediatamente después del proceso de separación de ambas fracciones, así como en las células derivadas de ambas fracciones tras 5 días de cultivo en SpherM y en las células obtenidas tras la diferenciación de un único esferoide sembrado sobre Poli-L-lisina y crecido en DifM4. Los resultados obtenidos en la figura 25 muestran que los marcadores característicos de células madre Prop1 y Oct4 se expresaban fuertemente en la fracción de células GFRa2+ y estaban ausentes de las células GFRa2-. La expresión de hormona del crecimiento (GH) sigue estando presente tras el proceso de purificación, probablemente debido a la abundancia de somatotropas en la hipófisis que origina la contaminación de ese 10% de fracción GFRa2+. Tras el cultivo en medio SpherM, la expresión de los marcadores GFRa2, Prop1 y Oct4 decae en los esferoides obtenidos de las células GFRa2+ aunque los marcadores de células madre siguen estando presentes en los esferoides y la posición de la banda correspondiente a GFRa2 se desplaza hacia arriba debido a que GFRa2 presenta 3 isoformas, y se detectan dos isoformas distintas, una en las células recién purificadas y otra transcurridos cinco días de cultivo, no se detecta presencia en los esferoides del marcador de células secretoras GH o del marcador de diferenciación beta-tubulina III. Cuando se induce la diferenciación de los esferoides, dejan de detectarse los marcadores característicos de las células GFRa2+, pero se expresan de nuevo GH y tubulina-beta III.

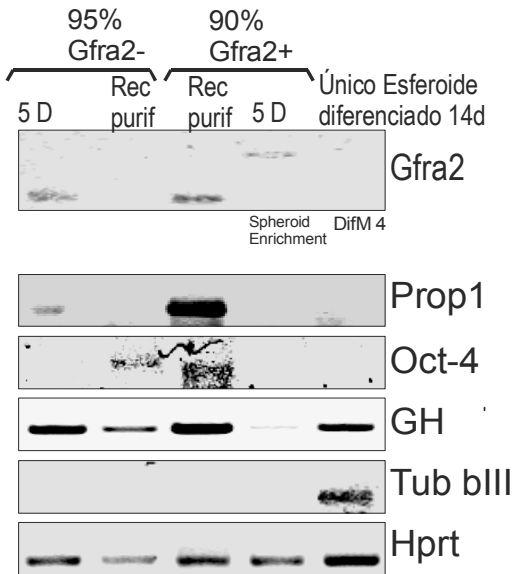


Fig. 25.- **Expresión específica de RNAs a lo largo del proceso de diferenciación.** Se muestra la electroforesis tras la RT-PCR en extractos de las muestras que se indican sobre los carriles: la fracción de células excluidas de la columna de purificación de células GFRA2+ (95% GFRA2-) o la fracción de células retenidas en la columna y posteriormente eluidas (90% GFRA2+), en cada uno de los casos bien cuando estaban recién purificadas (Rec purif) o tras 5 días en cultivo (5D), así como muestras obtenidas de células diferenciadas a partir de un único esferoide después de 14 días sobre poli-L-lisina en medio de diferenciación DifM4. A la izquierda se indica el gen al que corresponde el fragmento de mRNA amplificado en cada caso.

4.5.- CRECIMIENTO DE GPS COMO CÉLULAS MADRE. AMPLIFICACIÓN

Debido a la característica de auto-renovación (self renewal), las células madre tienen capacidad para perpetuarse, mediante divisiones mitóticas simétricas que originan células hijas, de características similares a la célula progenitora.

Por tanto, al poner células madre en cultivo, si son verdaderas células madre, deben dividirse de forma indefinida mientras no se diferencien.

Probamos tres formas distintas de cultivar las células GFRA2+ y hacerlas crecer a lo largo de pases consecutivos:

A) En plástico, y con SpherM, donde las células GFRA2+ crecen como esferoides (fig. 26 A). Estos se pueden crecer durante 2 pases pero cada vez hay menos células.

B) En placas cubiertas con gelatina y con medio condicionado de MEFs al 50% y SpherM (MEFM). En este tipo de cultivo, las células se fijan a la superficie y crecen como células dispersas GFRA2+/Prop1+. Sin embargo, con los pases, algunos grupos de células se diferencian y forman estructuras en forma de cordón o aparecen colonias de pigmento rojo y disminuye el número de células GPS dispersas (fig. 26 B).

C) Cuando se cultivan directamente encima de MEFs tratados con mitomicina-C, (que impide que los MEFs puedan dividirse), y en presencia de StemM (medio de células madre), las células GFRA2+ forman colonias. Algunas colonias presentan cilios en el polo apical (fig. 26 C). Este método, es el usado con mayor frecuencia para el cultivo de células madre embrionarias. Pero las células crecen en colonias en el primer pase, pero en los siguientes pases las células se diferencian y no forman colonias.

D) Cuando se agrega ESGRO (LIF) al medio condicionado de MEFs (MEFM+E), las células no se adhieren a la superficie cubierta de gelatina, pero crecen lenta, pero constantemente, a medida que van formando esferas compactas. Estas células se “pasaron” cada 25 días (fig. 27A) y crecían de forma muy lenta, por lo que el rendimiento era muy bajo. Observamos que estas células seguían expresando los marcadores de células madre mediante PCR (fig.27B). Parece que este último medio es el más efectivo para amplificar las células madre GPS pero que necesitamos mejorarlo todavía más.

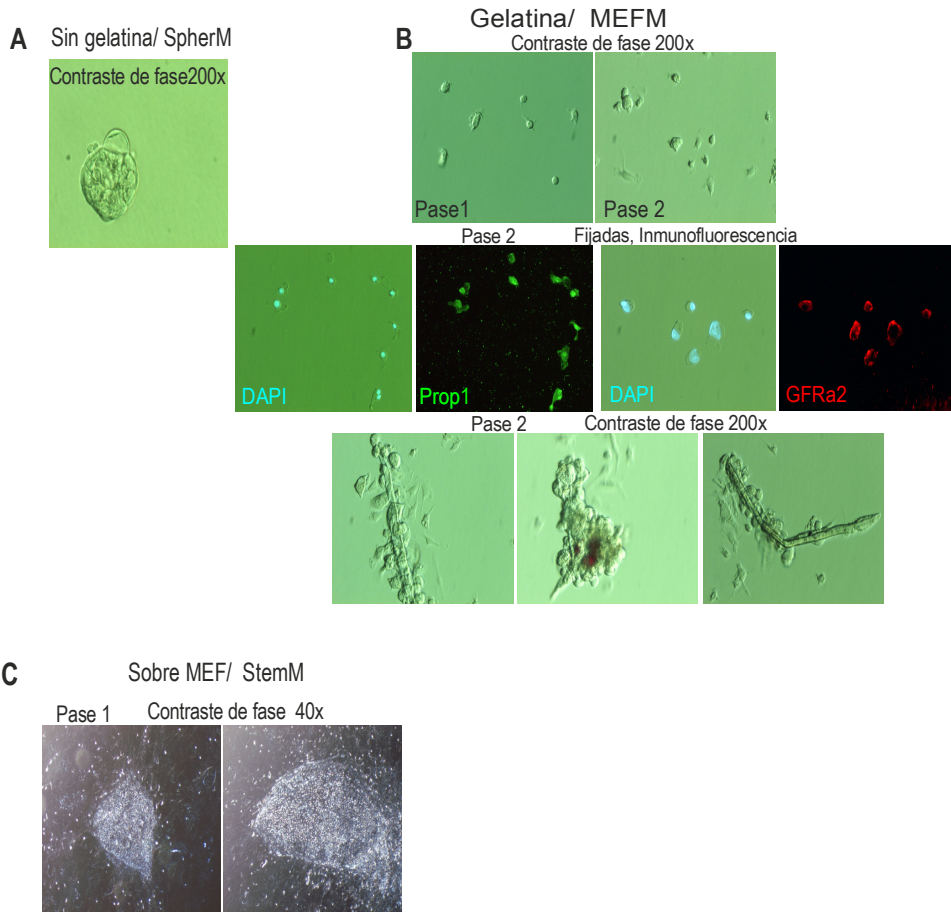


Fig. 26.- Formas de cultivo de las células GFRA2+ purificadas mediante MACS. **A)** Sin gelatina y con SpherM, crecen como esferoides. **B)** Placas con gelatina y en MEFM (50% medio condicionado de MEFs, crecen como células dispersas y la inmunofluorescencia muestra que son positivas para GFRA2 y Prop1, sin embargo con los pases un pequeño número se diferencian espontáneamente en diferentes estructuras celulares. **C)** Cultivadas directamente en MEFs tratados con Mitomicina-C crecen en forma de colonias que en ocasiones muestran cilios en el polo apical.

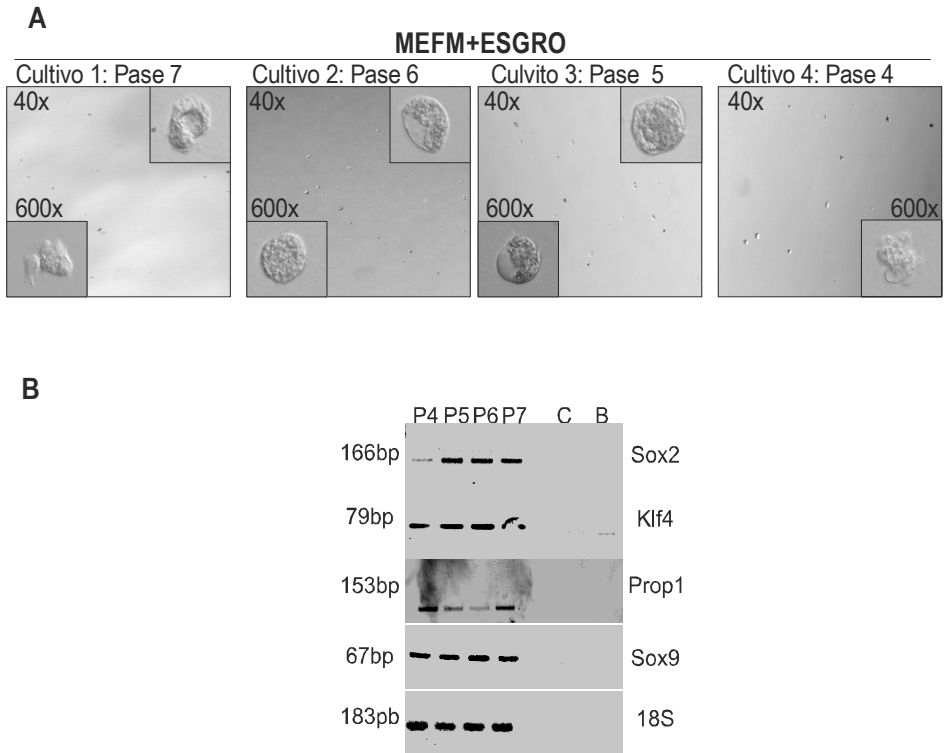


Fig. 27.- Formas de cultivo de las células GFRA2+ purificadas mediante MACS. A) Placas con gelatina, en MEFM (50% medio condicionado de MEFs) y ESGRO, crecen formando esferas compactas. Se pasaron las células cada 25 días, hasta un mínimo de 5 veces. Se muestran diferentes pases de 4 cultivos independientes. **B)** Muestra la expresión del mRNA para los genes marcadores de células madre (Sox2, Klf4, Prop1, Sox9) del pase 4 al 7 (P4, P5, P6, P7).

4.6.- LA IMPORTANCIA DEL NICHU DE CÉLULAS GPS EN LA FISIOLÓGÍA DE LA HIPÓFISIS IN VIVO

No se sabe mucho sobre la renovación de las células de la hipófisis durante toda la vida y de su regulación homeostática en cambios fisiológicos específicos, tales como la pubertad o el embarazo, o en patologías como el hipotiroidismo, hipogonadismo o el desarrollo tumoral.

Para explicar el aumento de número de células de la hipófisis inducido en circunstancias fisiológicas se ha propuesto un aumento de la proliferación de las diferentes células secretoras individualmente y/o un aumento de la proliferación asimétrica seguida de una posterior diferenciación a partir de posibles células madre adultas (Melmed, 2003; Vankelecom, 2007).

En la figura 28 se han estudiado los cambios en la expresión de los marcadores de células madre, así como de los marcadores de diferenciación de las células productoras de hormonas como Pit-1, en las células GPS de la hipófisis de rata, desde el nacimiento hasta la edad adulta. Se observa que los marcadores de células madre disminuyen con la edad, principalmente después del día 15, en el inicio de la pubertad, medido por el pico de la expresión de Pit-1. El pico de RET precede al pico de Pit-1, se mantiene en la pubertad y luego disminuye, sugiriendo un papel para RET en la formación /diferenciación de nuevas células somatotropas. Este comportamiento se corresponde con que RET es un marcador tanto de las células GPS como de células somatotropas.

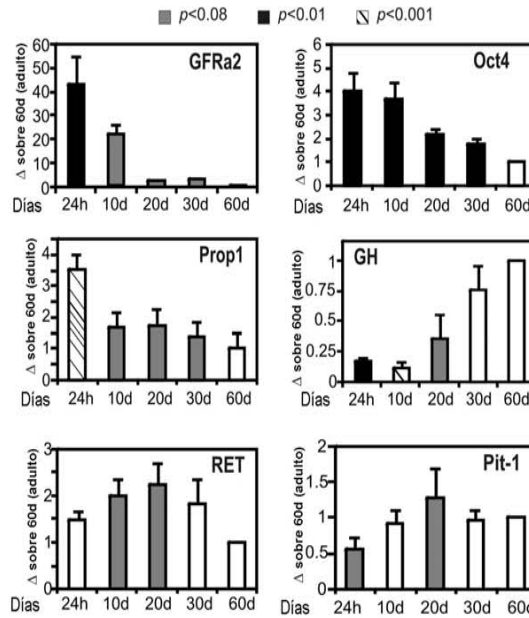


Fig. 28.- **Expresión del mRNA a lo largo del desarrollo posnatal.** Representan el factor de variación observado respecto al valor obtenido en muestras de hipófisis adultas (60d) en el análisis cuantitativo por qRT-PCR de la expresión de GFRa2, Oct4, Prop1, GH, Ret y Pit1 en la adenohipófisis de ratas recién nacidas (24h: 24 horas) e hipófisis de ratas de 10, 20, 30 y 60 días (10d, 20d, 30d, 60d). Se observa que la expresión de los marcadores de células progenitoras GFRa2, Oct4, Prop1 disminuye con la edad, mientras que la expresión del marcador de células somatotropas Pit-1 presenta un pico hacia la pubertad y se observa un pico de RET antes que el pico de Pit-1.

Cuando se estudió la proliferación del nicho a través de la expresión de Ki-67/GFRa2 mediante doble inmunofluorescencia, encontramos muchas células en ciclo celular en el nicho GPS en las hipófisis de 10 días, en comparación con las hipófisis adultas (60 días), donde las divisiones eran escasas (fig. 29). Esto demuestra que las células GPS, presentan un ciclo celular más rápido durante el desarrollo posnatal, pero van perdiendo su capacidad proliferativa a medida que el

animal llega a la edad adulta. Esta baja tasa de proliferación es característica de las células madre, las cuales in vivo se dividen más lentamente.

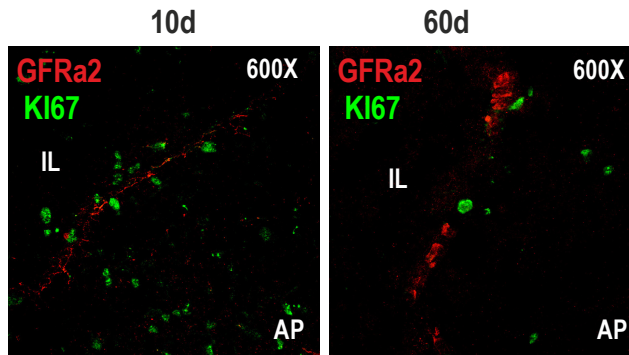


Fig. 29- **Proliferación de las células GPS: alta en animales jóvenes y baja en adultos.** Doble inmunofluorescencia de Ki67/GFRa2 en hipófisis de rata jóvenes de 10 días y adultas de 60 días, observándose abundante proliferación en el nicho de células GPS a los 10 días, en contraposición a la hipófisis de rata adulta. AP, adenohipófisis, IL, lóbulo intermedio.

También realizamos experimentos de retención de BrdU, que consiste en la retención en las células de BrdU en la infancia. Aunque BrdU, se va perdiendo a medida que las células se dividen, debido a las pocas divisiones celulares de las células madre, después del nacimiento, estas aparecerán marcadas con BrdU, en la edad adulta, tal como se ha demostrado en diversos tejidos de rata como el páncreas o la cápsula renal (Duvillie et al., 2003; Oliver et al., 2004).

Esta técnica se describió detalladamente en el apartado 3.6 de materiales y métodos, y básicamente consiste en la inyección de BrdU inmediatamente después del nacimiento, y en la extracción de las hipófisis en la edad adulta. Posteriormente realizamos inmunofluorescencia para BrdU y observamos que la

retención de BrdU se realiza específicamente en el nicho de células GPS. Estos resultados sugieren que el nicho de células GFRA2+ se replican lentamente después del nacimiento, una propiedad compartida por la mayor parte de las células madre/progenitoras (Fig.30).

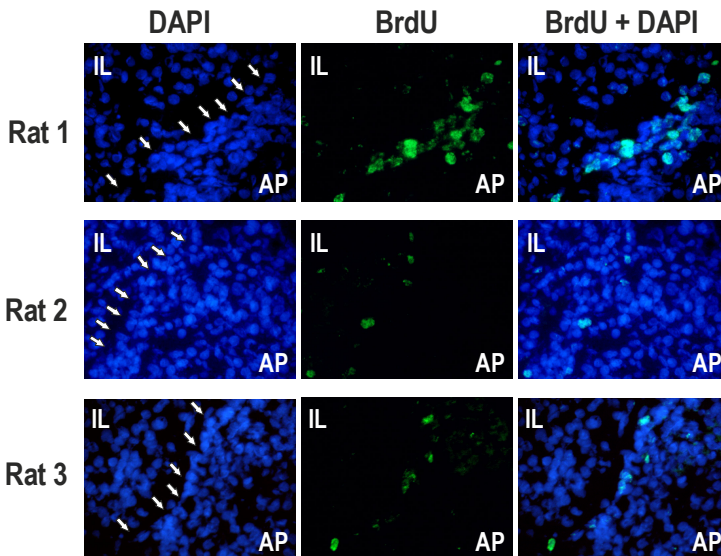


Fig. 30- Las célula GPS se comportan como células madre en la hipófisis in vivo. Retención de BrdU en el nicho GPS correspondientes a 3 ratas diferentes de 60 días inyectadas con BrdU en el día 1 postnatal. AP, adenohipófisis, IL, lóbulo intermedio; NP, neurohipófisis. Tinción de núcleos DAPI.

Con el fin de confirmar la capacidad de división lenta de las células GPS, se midió la longitud de los telómeros de las células adenohipofisarias por Telomapeo (Telomapping). El principio de la prueba reside en que las células madre se dividen simétricamente (muy lentamente) o asimétricamente, dando lugar a una célula GPS que se mantiene en el nicho y una célula progenitora que

entra en la adenohipófisis y se divide unas cuantas veces antes de quedar completamente diferenciada, y en cada división va acortando la longitud de los telómeros gradualmente (fig. 31). Nos planteamos aplicar la técnica de Telomapeo, en colaboración con I. Flores y M. Blasco, que es un ensayo FISH de telómeros cuantitativo por confocal, seguido de un tratamiento automatizado de las secciones, (Flores et al., 2008). Nuestra hipótesis fue que, ya que en cada división los telómeros se acortan, en las células progenitoras y en las células diferenciadas habría progresivamente telómeros más cortos en comparación con el nicho de células GPS. Nuestros resultados sobre hipófisis normales de ratones adultos, demuestran un gradiente longitudinal de los telómeros en la adenohipófisis, localizándose los más largos en las células de la zona marginal de la hipófisis y los más cortos en las células diferenciadas más alejadas de la zona marginal (fig. 31 A).

Se encontró una línea fina de núcleos que contienen telómeros largos, exactamente en la primera línea de células del límite entre el lóbulo intermedio y la adenohipófisis (regiones I), que se corresponde en su posición con el nicho de células GFRa2+; las siguientes líneas de células en dirección hacia la adenohipófisis o lóbulo intermedio/neurohipófisis presentan un acortamiento de los telómeros, mientras que el grueso de células secretoras tienen telómeros cortos, característicos de células diferenciadas. En la parte B de la figura 31 se esquematiza las diferentes regiones encontradas en la hipófisis según la longitud de los telómeros, mientras que en la figura 32 se muestran gráficos de barras acumulativos con los tantos por uno que representan las células cuyos telómeros están comprendidos en cada uno de las tres regiones (I, II, III) señaladas a la derecha de la imagen dentro del lóbulo intermedio y de la adenohipófisis.

El análisis de telomapeo cuantificado (fig. 32) indica que la región I de la adenohipófisis contiene en su mayor parte células con telómeros largos: alrededor del 28% de la región I de la adenohipófisis corresponde a células “en reposo” cuyos telómeros muestran una señal de fluorescencia equivalente a 18000-30000 unidades arbitrarias de fluorescencia, que aparece de color rojo en las fotografías de la columna derecha de la figura 31 C. Es interesante que los telómeros más largos de la hipófisis se marquen específicamente en la zona marginal, donde están localizadas las células GFRA2+. En el lóbulo intermedio, las únicas células con telómeros largos están localizadas también en la región I en la zona marginal. El porcentaje de células con telómeros largos disminuye progresivamente en las regiones II y III, donde se encuentran dispersas algunas células con largos telómeros. La mayor parte de las células de la adenohipófisis mostraban telómeros cortos, lo que sugiere un componente abundante de células maduras que han sufrido muchas divisiones celulares.

Estos resultados sugieren que las células progenitoras de la hipófisis están localizadas en la zona marginal, donde se localizan las células GFRA2+.

Para demostrar más a fondo la relevancia in vivo de las células GPS buscamos modelos de ratón con hipopituitarismo. El ratón nulo *Cdk4* tiene un fenotipo muy interesante que afecta a la proliferación celular, observándose una disminución de las células endocrinas, con el resultado de la reducción del número de células diferenciadas en el páncreas y en la hipófisis (Malumbres et al., 2004; Martin et al., 2003).

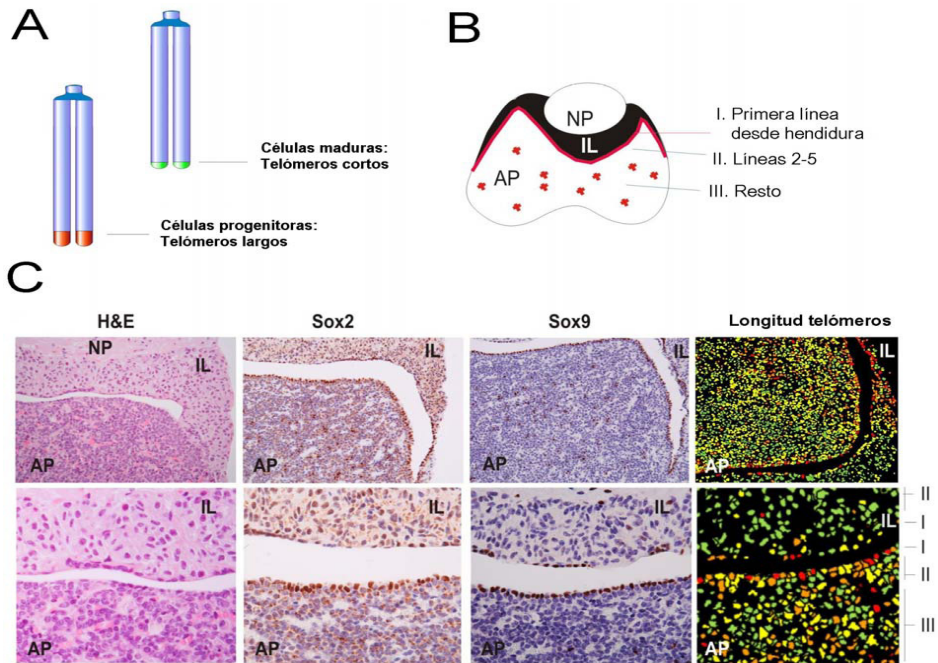


Fig. 31.- Longitud de los telómeros en adenohipófisis, zona marginal (nicho GPS) y lóbulo intermedio de hipófisis adultas. A) Los cromosomas de las células maduras diferenciadas tienen telómeros cortos, frente a los de células madre progenitoras que tienen telómeros largos. **B)** Esquema de la distribución de las células en la hipófisis de ratón según la longitud de sus telómeros. La línea de color gris (línea I) situada entre el lóbulo intermedio (IL) y la adenohipófisis (AP) corresponde a una línea fina de núcleos que contienen telómeros largos. Las siguientes líneas de células en dirección a la AP o a IL/NP (II: “Líneas 2-5”) presenta un acortamiento de los telómeros; el grueso de las células secretoras (III: “Resto”), tienen los telómeros cortos característicos de células diferenciadas. **C)** Tinciones de hipófisis normales de ratón: hematoxilina y eosina (H&E) (fotografías de la izquierda), inmunocitoquímica con anticuerpos frente a Sox2 o Sox9, mostrando las células GFRa2+ en los límites de la adenohipófisis /lóbulo intermedio (región I de la AP (adenohipófisis) y región I del lóbulo intermedio (IL) y algunos grupos dispersos por la adenohipófisis (principalmente en la región III de la adenohipófisis). A la derecha se representa el telomapeo en muestras de los mismos animales, que corroboran que los telómeros más largos aparecen en esas mismas zonas: las señales rojas (las señales indicativas de mayor intensidad de fluorescencia, correspondientes aproximadamente a 18000-30000 unidades arbitrarias de fluorescencia) aparecen en la línea correspondiente a la zona marginal (región I), mientras que las líneas de células de la región II de la adenohipófisis (AP), progresivamente más alejadas de la hendidura, presentaban señales menos intensas (naranja), correspondiendo la señal más tenue (verde) a las células secretoras de la adenohipófisis.

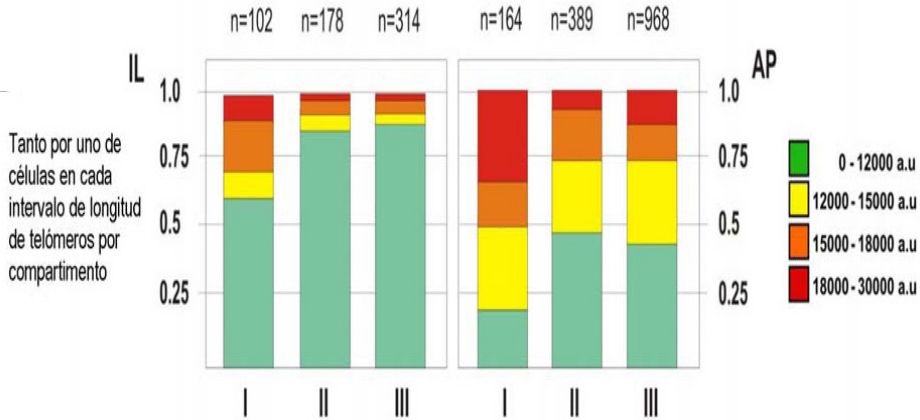


Fig. 32.- **Tanto por uno, de células comprendidas en cada uno de los intervalos de longitud de telómeros.** Se representa el tanto por uno, de células comprendidas en cada uno de los intervalos de longitud de telómeros, que se indican en unidades arbitrarias a la derecha de los gráficos, en cada uno de los compartimentos, (I, II ó III), del lóbulo intermedio, (gráfico de la izquierda, marcado “IL”), o de la adenohipófisis (gráfico de la derecha, marcado como “AP”). Zona marginal (región I), líneas de células en dirección a la AP o a IL/NP (II: “Líneas 2-5”), células secretoras (III: “Resto”).

Los ratones deficientes en Cdk4 (Cdk4(n/n)), que se obtiene por la inserción del gen de la resistencia a neomicina en el intrón 1 de Cdk4 (Rane et al., 1999) muestran una hipófisis hipoplásica, mucho más pequeña que la hipófisis del ratón normal, con una disminución dramática de todas las células secretoras de hormonas de la adenohipófisis durante la vida postnatal (fig. 33 B centro)

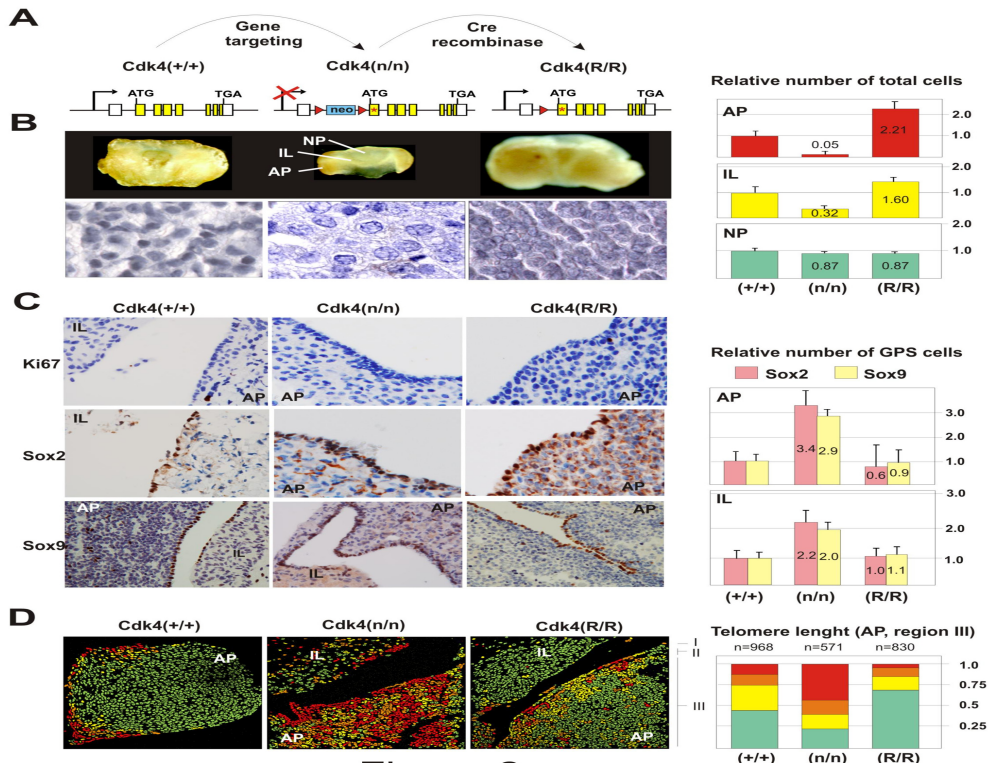


Fig. 33.- Incremento relativo del número de células progenitoras GPS y reducción de la formación de células endocrinas en el ratón nulo Cdk4. **A)** Alelos usados en el análisis de las células GPS en el ratón nulo Cdk4 (Cdk4(n/n)): el alelo con el Cdk4 anulado, obtenido por la inserción de resistencia a neomicina en el intrón 1 de Cdk4. El rescate, a través de la recombinasa Cre, provoca la eliminación de la resistencia a la neomicina, y da lugar a un Cdk4 mutado Cdk4(R/R), que expresan alelos mutantes Cdk4R24C, que codifica una Cdk4 hiperactiva. **B)** Inmunohistoquímicas de hipófisis de ratones salvajes Cdk4 (+/+); ratones nulos, Cdk4(n/n), y ratones en los que se ha rescatado la expresión de Cdk4, Cdk4(R/R). Las gráficas indican la relación entre el número total de células en los distintos lóbulos de la hipófisis (AP: adenohipófisis; IL: lóbulo intermedio; NP: neurohipófisis) con respecto al ratón salvaje Cdk4(+/+). **C)** Inmunohistoquímica de Ki67, Sox2 y Sox9 en la zona marginal de ratones Cdk4(+/+), Cdk4(n/n) y Cdk4(R/R), donde se observa que el nicho de células GFRA2+ aparece engrosado. Los gráficos muestran el número total de células Sox2+ o Sox9+ detectados en la adenohipófisis (AP) y el lóbulo intermedio (IL) en cada uno de los tres tipos de ratones, respecto a los ratones salvajes, Cdk4(+/+). **D)** Fotografías del telomapeo realizado en hipófisis de ratones Cdk4(+/+), Cdk4(n/n) y Cdk4(R/R). Se observa una tinción roja (correspondiente a telómeros largos) por toda la hipófisis de los ratones Cdk4(n/n), mientras que en los ratones Cdk4(+/+) y Cdk4(R/R) la tinción en rojo se concentra en la zona marginal, con algunos puntos dispersos por la adenohipófisis. El gráfico representa el tanto por uno de células comprendidas en la región III de la adenohipófisis, observándose que aproximadamente un 48% de las células de los ratones Cdk4(n/n) muestran telómeros largos, mientras que los ratones Cdk4 (+/+) y Cdk4(R/R) muestran aproximadamente un 12%.

Cuando estudiamos la hipófisis de estos ratones Cdk4 (n/n) se encontró una tinción normal de Ki67 durante el desarrollo embrionario, pero una disminución de la proliferación después del nacimiento, de forma similar a lo que se había observado previamente en las células endocrinas del páncreas (Martin et al., 2003).

La presencia de células GPS no sólo se mantuvo en los ratones Cdk4(n/n), sino que aumento en estos animales, presentando estos más capas celulares (fig. 33 C) lo que sugiere una producción normal de estas células durante el desarrollo embrionario, pero una diferenciación anormal en células productoras de hormonas. Así, mientras que los ratones de tipo salvaje contenían aproximadamente 0,9% de células GFRa2+, estas células muestran un enriquecimiento de 3-3,5 veces en la adenohipófisis y de 2 veces en el lóbulo intermedio de los ratones Cdk4(n/n) (fig. 33 C). En cambio, a pesar de que el número total de células productoras de hormonas disminuye en los animales deficientes en Cdk4 (fig. 34), el porcentaje relativo de células productoras de hormonas no se ve alterado en gran medida en los ratones deficientes en Cdk4, lo que sugiere una reducción del número de células totales en la producción de todas estas células a partir de estos progenitores.

También encontramos que estos ratones Cdk4(n/n), presentaban un aumento de células con los telómeros largos (aproximadamente un 48%) (fig. 33 D), mientras que hubo una fuerte reducción del número de células con telómeros cortos que coincidía con el pequeño tamaño de la hipófisis y el hipopituitarismo de los ratones (enanismo, hipogonadismo). Cuando se realizó el rescate del Cdk4(n/n) mediante un Cdk4 mutado (Cdk4(R/R), permanentemente activo, no

sólo aumento el número de células diferenciadas con los telómeros cortos sino también el tamaño total de la adenohipófisis.

Estos datos muestran la relación entre las proteínas del ciclo celular y las células madre del nicho GPS en la hipófisis, relacionando las células GFRa2+ con el crecimiento postnatal de la hipófisis y sugiriendo que Cdk4 participa en el control de la proliferación postnatal de este nicho de células.

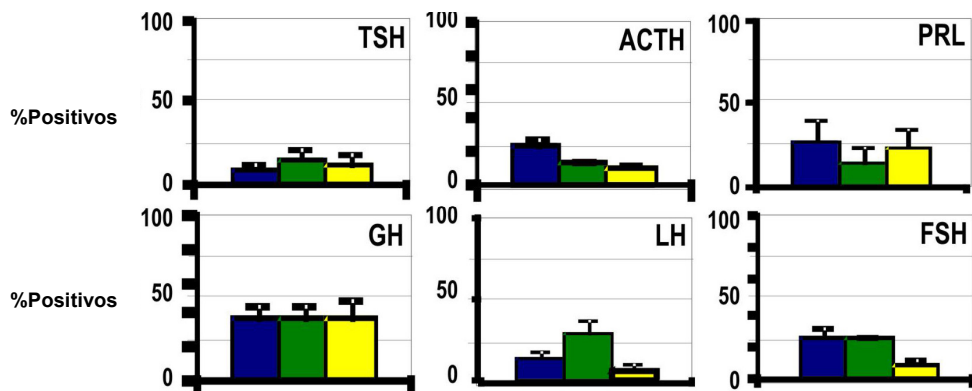


Fig. 34.- **Porcentaje relativo de las células productoras de hormonas en el ratón nulo para Cdk4.** Muestra el porcentaje relativo, respecto al total de células de la hipófisis, de células productoras de las hormonas que se indican en la parte superior derecha de cada uno de los gráficos, detectadas en ratones salvajes Cdk4(+/+) (barra azul), en ratones Cdk4(n/n) en los que se ha anulado la expresión de los dos alelos del gen Cdk4 (barra verde) y en ratones Cdk4(R/R) en los que se ha rescatado la expresión del gen (barra amarilla). Se observa que el porcentaje de células productoras de hormonas no se encuentra altamente alterado en los ratones nulos Cdk4, lo que sugiere una deficiencia general en la producción de todos los progenitores de células endocrinas.

5.- Discusión

5.- DISCUSIÓN

La hipófisis es un órgano endocrino esencial para la vida. Regula funciones fisiológicas básicas como el crecimiento, la reproducción o la homeostasis metabólica. La hipófisis en mamíferos se genera a partir de la bolsa de Rathke y su desarrollo termina poco después del nacimiento y no sufre cambios aparentes en la fase adulta (Zhu et al., 2007). No obstante, se conoce poco acerca de la homeostasis celular de la hipófisis en la etapa adulta, así como, de la regulación plástica durante determinadas situaciones fisiológicas que afectan a la hipófisis, como la pubertad o el embarazo, o en condiciones patológicas como el desarrollo tumoral.

Durante el desarrollo neuronal, GDNF promueve la supervivencia y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas. También actúa sobre la supervivencia de las neuronas motoras y otras subpoblaciones neuronales en el sistema nervioso central y periférico. Pero durante el desarrollo embrionario GDNF no solo se limita al sistema nervioso sino que también es esencial para la formación de otros órganos como los riñones, el tracto gastrointestinal, el ovario y los testículos.

Nuestro grupo demostró la expresión del complejo de receptores RET/GFRa1 y su ligando GDNF en la hipófisis anterior de rata y de humano. De todas las células secretoras de la adenohipófisis, este complejo se expresa específicamente en las células somatotropas en las cuales regula la diferenciación y la supervivencia (Urbano et al., 2000; Japon et al., 2002). Siguiendo con esta línea de investigación, estudiamos en la adenohipófisis la expresión de otros co-receptores que pertenecían a la familia de co-receptores alfa

de GDNF. Detectamos la expresión de los co-receptores GFRa2 y GFRa3, pero sin embargo no detectamos la expresión del co-receptor GFRa4.

Hasta el momento no se había detectado la expresión de GFRa2 ni de GFRa3 en la hipófisis.

En ratón y humano, los mayores niveles de expresión del mensajero de GFRa2 se observaron en el cerebro, bazo, pulmón y testículo, mientras que en el corazón, el hígado, músculo esquelético y el riñón se habían encontrado cantidades más bajas de GFRa2 (Too, 2003). La expresión de GFRa3 en humanos se ha demostrado en el sistema nervioso, principalmente en el cerebelo y la médula espinal, así como en el colon, el intestino delgado, páncreas, corazón, testículos y próstata (Masure et al., 1998). Sin embargo estos estudios carecen de una demostración de la expresión de la proteína, y de la localización celular precisa de estos receptores GFRa en cada uno de esos órganos. Recientemente se ha demostrado, en ratones, la expresión del mRNA y de la proteína de GFRa3 en embriones preimplantación y en el oviducto al principio del embarazo (Li et al., 2009).

En este trabajo hemos caracterizado una población celular específica de la zona marginal de la hipófisis de roedores y humanos, que expresa el co-receptor de la familia de GDNF, GFRa2, como marcador específico no compartido con otras células de la hipófisis. Estas células también son positivas para el receptor tirosina-quinasa RET. Estas células también co-expresaban el receptor alfa 3 de GDNF, GFRa3, así como marcadores de células madre tales como OCT4, miembros de la familia de factores de transcripción Sox (SOX2 y SOX9) y el factor de transcripción específico de hipófisis Prop1. Además aproximadamente la

mitad de las células expresan S100, pero son claramente negativas para Nanog y Nestin y las hormonas hipofisarias. Denominamos a estas células, células GPS (GFRa2+/PROP+/STEM CELL+ (SOX2, SOX9, OCT4) (fig. 1).

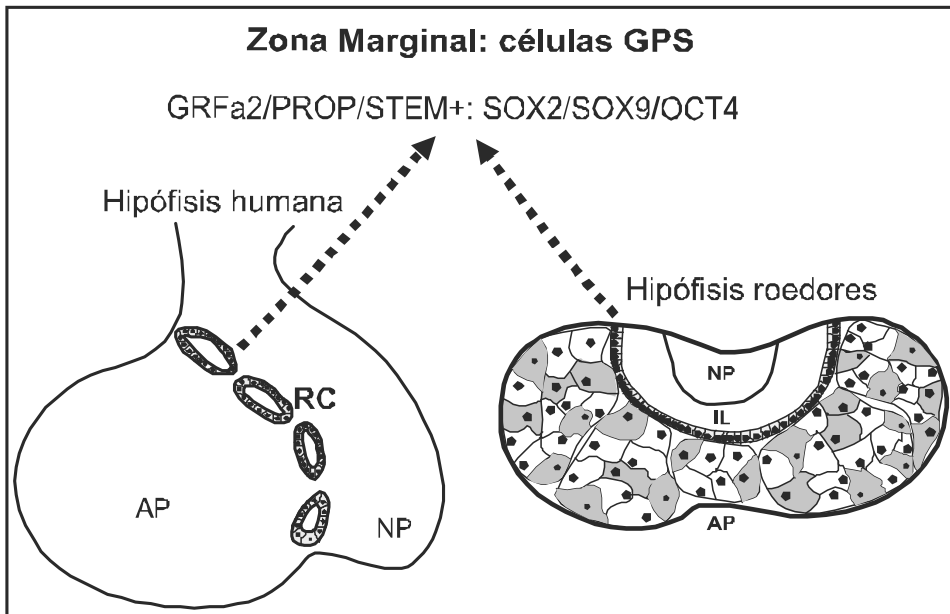


Fig. 1.- Localización de las células GPS en la hipófisis de roedores y humanos. Adenohipófisis (AP), neurohipófisis (NP), lóbulo intermedio (IL), quistes de Rathke (RC). En las hipófisis de roedores se representan en gris las células productoras de GH y en blanco el resto de células secretoras de la hipófisis.

5.1.- EL NICHOS DE CÉLULAS MADRE EN TESTÍCULO: UN MODELO

La espermatogénesis en mamíferos es un proceso estrictamente regulado y continuo en el que las células madre espermatogonias (SSC) residen en la parte basal del epitelio seminífero, en contacto con la membrana basal y las células de Sertoli. El mantenimiento y la auto-renovación de las SSC está fuertemente regulado por señales extrínsecas del microambiente que las rodea, conocido con “nicho de las células madre espermatogonias”. El nicho tiene un papel importante en la decisión que toma una célula madre sobre renovarse a sí misma (división simétrica) o diferenciarse (división asimétrica), constituyendo una unidad básica de la fisiología del órgano.

La diferenciación germinal en los testículos de ratón comienza desde una pequeña población de células llamadas espermatogonias A_s (*Asingle*). Parte de las células generadas por división de las células A_s permanecen conectadas después de la mitosis y contribuyen a su renovación. Por otra parte, una serie de divisiones mitóticas sucesivas da lugar a las células A_a (*Aaligned*). Éstas a su vez dan lugar a las espermatogonias $A1$, $A2$, $A3$, $A4$, intermedias y tipo B , que se dividen finalmente en espermatocitos entrando a continuación en la primera división meiótica. La fracción A_s está dotada con las propiedades de las SSCs, mientras que la funcionalidad de las células A_a aún está en discusión. Podrían ser parte de la fracción de SSCs, o estar ya comprometidas irreversiblemente en la ruta de diferenciación.

En humanos se reconocen dos tipos de espermatogonias, las A_{dark} , que son las SSCs propiamente dichas, con una baja actividad mitótica en condiciones

normales, con una función regenerativa y que se corresponderían con las espermatogonias A_{single} de ratón; y las A_{pale} , que tienen función de células progenitoras que producen un elevado número de células hijas diferenciadas y se corresponderían con las espermatogonias $A_{aligned}$ de ratón.

Todavía no están bien establecidos los marcadores moleculares que determinan la pluripotencia y autorenovación de las SSCs en roedores y humanos. Algunos autores proponen a GFRa1 como un marcador de las SSC de ratón e humano. Mediante doble marcaje demostraron la co-localización de GFRa1 y OCT4 en espermatogonias de ratón (He et al., 2007). Otros autores proponen a c-Ret, el receptor tirosina kinasa para GDNF, como probable marcador de las células espermatogonias indiferenciadas de ratón (Dadoune, 2007). Otro marcador tirosin kinasa, c-kit, se define como un marcador de spermatogonias diferenciadas. Como no hay un único marcador para distinguir las SSCs y las espermatogonias progenitoras ya comprometidas a diferenciarse se suelen utilizar dos o tres anticuerpos para caracterizar sus fenotipos. Otros autores también proponen el receptor 125 acoplado a la proteína G (GPR125) como marcador común de células madre adultas y células progenitoras en espermatogonias de ratón y humanos (Seandel et al., 2008).

Las SSC expresan el complejo de receptores RET/GFRa1 y se ha demostrado que GDNF es secretado por las células de Sertoli después del nacimiento y hasta ahora es el único factor trófico conocido responsable del mantenimiento y auto-renovación de las SSC a través de la señalización por GDNF/RET/GFRa1. Los distintos estudios sobre los efectos de GDNF en las SSCs indican que existen múltiples vías de señalización responsables de la auto-renovación y mantenimiento de las células madre espermatogonias. Cuando

GDNF se une a su receptor GFRa1, RET activa diferentes vías de señalización como la vía de señalización de Src, a través de la familia a kinasas Src las cuales activan la vía de señalización PI3K/Akt (Braydich-Stolle et al., 2007) o la vía de señalización de Ras a través de la activación de la proteína Shc y Grb2 las cuales inducen la vía de Ras/ERK1/2 (He et al., 2008). Ambas vías inducen la proliferación de las SSCs.

Un estudio reciente realizado por el grupo Pandolfi en el cual usando como modelo espermatogonias progenitoras (SPCs) de ratón, demuestra que GDNF es un factor de crecimiento fundamental para el mantenimiento de la autorrenovación de las células madre espermatogonias (Hobbs et al., 2010). Así, la pérdida de PLZF conduce a una disminución de la expresión de REDD1 lo que conduce a una hiper-activación de mTORC1. El aumento de la señalización de mTORC1 en las células SPCs PLZF^{-/-} activa un ciclo de retroalimentación negativa que reprimen la expresión de los componentes del receptor de GDNF, GFRa1 y c-Ret, lo cual conduce a la inhibición de la señalización de GDNF. La falta de sensibilidad a la estimulación por GDNF conduce a la pérdida de la autorrenovación de las células SSCs, lo que desencadena la diferenciación celular y / o apoptosis. En condiciones normales las células SPCs expresan PLZF, que mantiene altos los niveles de REDD1, inhibiendo la expresión de mTORC1 permitiendo que GDNF ejerza su función de mantenimiento de la auto-renovación de las células madre, a través de la vía de RET/GFRa1. Este mecanismo homeostático equilibra la auto-renovación de las SPCs.

Nuestros resultados muestran que las células GPS están situadas en una población celular específica de la zona marginal de la hipófisis, las cuales expresan el co-receptor de la familia de GDNF, GFRa2, como marcador

específico no compartido con otras células de la hipófisis. Estas células también son positivas para el receptor tirosina-quinasa RET. Observamos que el ligando de GFRa2, NTN (neurturina) se expresa en pequeñas agrupaciones de células dentro de la adenohipófisis lo que sugeriría que podría haber una señalización implicada en la vía GFRa2/RET/NTN, en la cual NTN estaría manteniendo la auto-renovación/diferenciación de las células GFRa2 positivas a través de la vía de RET de forma similar a la función descrita para GDNF en las células madre espermatogonias.

5.2.- EL PAPEL DE RET Y SU CO-RECEPTOR GFRa2 EN LA HIPÓFISIS

El receptor RET es un receptor tirosin-quinasa que se expresa durante el desarrollo en muchos órganos, tales como el sistema nervioso y los riñones. En los mamíferos RET tiene cuatro ligandos diferentes y cuatro diferentes receptores alfa GFRa 1-4. Pero RET no solo se expresa durante el desarrollo sino también en algunos órganos durante la edad adulta. Nuestro grupo ha trabajado en la expresión del receptor RET en la hipófisis de roedores y de los seres humanos (Urbano et al., 2000; Japon et al., 2002). En la adenohipófisis, RET se expresa en las células somatotropas (productoras de GH), donde también se expresan específicamente el co-receptor GFRa1 y su ligando específico GDNF. Recientemente también se ha detectado la expresión de RET en las células lactotropas (productoras de PRL) en la adenohipófisis de ratones hembras durante la gestación, la lactancia y el destete. Utilizando cultivos primarios de células de la hipófisis en diferentes etapas de la gestación y la lactancia en presencia o ausencia de GDNF, observaron que la ausencia de GDNF produce un aumento de la apoptosis durante el destete, RET actúa como un receptor de dependencia que

es capaz de inducir la muerte de las células en ausencia de ligando (Guillou et al., 2011).

Cuando cualquier ligando de la familia de receptores de GDNF se une a su respectivo co-receptor se induce la dimerización del receptor RET. Inmediatamente, los dominios tirosin-quinasa se cruzan activando las vías de transducción de señales específicas de cada tipo celular. Una de las acciones de esta vía es la supervivencia y la proliferación celular (Santoro et al., 2004; Arighi et al., 2005). El hecho de que RET pertenezca a la "familia de receptores de dependencia", significa que, en ausencia de ligando RET es procesado dentro de la célula e induce la apoptosis en muchas de las células que expresan este receptor. Así, las células que expresan RET dependen de la presencia constante de un ligando para sobrevivir. Esta acción dual de RET está presente en las células somatotropas y ha sido cuidadosamente estudiada por nuestro grupo. En ausencia de GDNF, RET induce la apoptosis a través de la sobreexpresión directa del factor de transcripción Pit-1, un factor de transcripción importante en el desarrollo y la diferenciación de la hipófisis, común a células somatotropas, tirotropas y lactotropas. La acumulación de Pit-1 induce p53 y la apoptosis. Llamamos a este mecanismo "over-differentiation" y ayuda a controlar tanto el número como la función de las células somatotropas. En ausencia del ligando GDNF, RET aumentaría Pit-1 lo que podría llevar a un exceso de GH, al no provocarse la muerte de las células somatotropas. Cuando está presente GDNF, RET mantiene controlada la expresión de Pit-1, lo que reduce la producción de GH, pero mantiene la supervivencia de las células somatotropas (Canibano et al., 2007). Recientemente hemos demostrado la relación del factor de transcripción Pit-1 con el gen p19Arf, encontrando en el promotor de ARF un lugar de unión para Pit-1. RET, en ausencia de ligando, activa la expresión de Pit-1 induciendo la apoptosis

a través de la vía p19Arf/p53 tanto en la línea celular de células somatotropas (GH4C1) como en cultivos primarios de hipófisis. Este hecho, a pesar de que Pit-1 no es un oncogén, podría incluir a Pit-1 dentro del grupo de oncogenes que promueven la apoptosis, como los genes *Ras* y *Myc*, denominados genes OIA (Oncogene induced apoptosis) que inducen la apoptosis a través de la vía Cdkn2a/p19Arf. Sin embargo hemos demostrado que en las células somatotropas la activación de p19Arf se rige exclusivamente por Pit-1, por lo tanto, las células somatotropas están protegidas contra la excesiva proliferación a través de la vía RET/Pit-1/p19Arf para prevenir las enfermedades debidas al exceso de GH como resistencia a la insulina, enfermedad metabólica o la acromegalia (Diaz-Rodriguez et al., 2011).

Las células GPS además del co-receptor GFRA2 también expresan el receptor RET aunque con una intensidad menor que en las células somatotropas. Hemos estudiado los cambios en la expresión de los marcadores de GPS (marcadores de células madre) y marcadores de diferenciación (hormonas, Pit1) en la hipófisis de rata desde el nacimiento hasta la edad adulta. Los marcadores de células madre disminuyen con la edad principalmente después del día 15, cuando se inicia la pubertad, medido por el aumento de la expresión de Pit-1. Una excepción es el receptor RET que aumenta en la pubertad para disminuir después. Este comportamiento se corresponde con que RET es un marcador tanto de las células GPS (células madre), como de las células somatotropas (diferenciadas) (fig. 2).

Así pues, la ruta de GFRA2/RET podría ayudar a regular la proliferación correcta de las células del nicho. La expresión del ligando NTN (neurturina) en células discretas a través de la adenohipófisis puede crear además un gradiente

que dirija estos procesos en las células GPS. En la hipófisis, el eje GFRa2/NTN/RET podría modular la fisiología de las células GPS controlando su supervivencia y diferenciación, mientras que el sistema GFRa1/GDNF/RET controla la diferenciación y el destino de las células somatotropas (muerte frente a supervivencia) a través de la regulación de Pit-1 (Diaz-Rodriguez et al., 2011; Canibano et al., 2007).

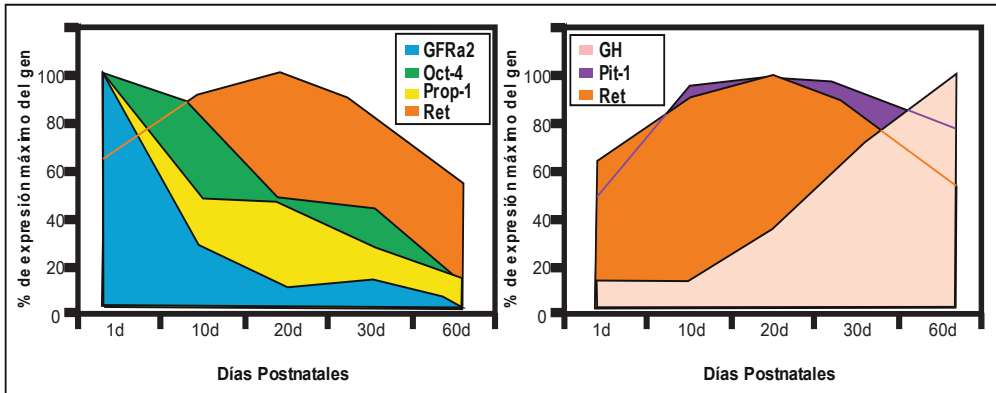


Fig. 2.- Cambios en la expresión de los marcadores de GPS en la hipófisis de rata desde el nacimiento hasta la edad adulta.

5.3.- EL NICHO DE CÉLULAS GPS (GFRa2+/PROP+/STEM CELL+ (SOX2, SOX9, OCT4) EN LA HIPOFISIS

5.3.1.- Células propuestas como candidatas a células madre de la hipófisis

Durante las últimas décadas, se ha demostrado la existencia de células madre en un gran número de tejidos, sin embargo la existencia de células madre en la hipófisis todavía no se ha aclarado. A lo largo de estos últimos años se han propuesto diferentes tipos celulares de la adenohipófisis como posibles candidatos a ser células madre.

Yoshimura propuso por primera vez una célula primordial en la hipófisis en 1969 (Yoshimura et al., 1969). Desarrolló una técnica para aislar los diferentes tipos de células de la adenohipófisis, según sus características ultraestructurales mediante microscopía de luz y electrónica. Separaron tres tipos celulares en la adenohipófisis, las células cromóforas, células indiferenciadas de naturaleza ambigua, las células intermedias entre células acidófilas o basófilas y las células acidófilas y basófilas, productoras de hormonas. Mediante un trasplante de las células adenohipofisarias no secretoras (células cromóforas) en el hipotálamo de ratas hipofisectomizadas, consiguió obtener células hipofisarias diferenciadas, secretoras de las hormonas hipofisarias. Sin embargo, las células acidófilas y basófilas aisladas por esta técnica estaban mezcladas con un pequeño número de las células intermedias. Por tanto en este estudio no queda clara la diferencia entre los distintos tipos celulares lo que no permitió afirmar ninguna conclusión.

Más tarde Kovacs y colaboradores mediante observaciones ultraestructurales e inmunohistoquímicas, tanto de hipófisis humanas tumorales como no tumorales, observaron que en un momento dado las células foliculoesteladas (FSC) que recubren los folículos pueden sufrir una retrodiferenciación y transformarse en FCS endocrinas. También observaron que los adenomas de prolactina presentaban pequeños folículos de nueva formación ricos en FCS positivos para S100 y GFAP mientras que los folículos más grandes presentaban un epitelio inmunonegativo para S100 y GFAP. Kovacs concluyó que la expresión de estos dos marcadores se limitaba a la fase inicial de la formación de células foliculoesteladas y teniendo en cuenta la plasticidad de las FSCs, sugirió podrían ser un tipo de células madre adultas pluripotentes. Sin embargo, en este estudio no se analizó ningún marcador de células madre (Horvath and Kovacs, 2002).

Las células madre expresan muchos transportadores de membrana, por lo que se sabe que bombean hacia afuera los colorantes vitales como el AMCA una sustancia fluorescente (beta-Ala-Lys-N-epsilon-AMCA), que se acumula en las células foliculoesteladas (Otto et al., 1996). Otro de los marcadores descritos es ACE (enzima convertidora de angiotensina) la cual se expresa en las células madre hematopoyéticas humanas y en las células madre mesenquimales. El grupo de Lepore describió una población de células de la hipófisis de ratón que denominaron PCFCs, células formadoras de colonias, las cuales eran AMCA+ ACE+ Sca-1+ (Lepore et al., 2006; Lepore et al., 2005). Estas células eran capaces de crecer *in vitro* como colonias adherentes, las cuales presentaban una limitada capacidad de diferenciación a células productoras de GH y de prolactina. Estos datos sugirieron que las células PCFC, presentaban características de células foliculoesteladas y de células madre. Pero no demostraron si conservaban la

capacidad de auto-renovación y pluripotencialidad. Tampoco demostraron si estas células eran capaces de diferenciarse a otro tipo de células hipofisarias secretoras de hormonas diferentes a las somatotropas y lactotropas, así como a otros linajes celulares. Además en este trabajo no analizaron ningún otro tipo de marcador de células madre. Lo que sí demostraron *in vivo* en secciones no fijadas de hipófisis es que las células PCFC AMCA⁺ se localizaban en las células epiteliales de la zona marginal de la hipófisis (MZ) entre el lóbulo intermedio y la adenohipófisis.

La presencia de células madre en la hipófisis también se intentó demostrar al cultivar una población aislada de células hipofisarias de ratón. Estas células fueron dispersas y aisladas mediante citometría de flujo usando el colorante vital Hoechst. Seleccionaron las células por su bajo marcaje en Hoechst y las denominaron población paralela “side-población” (células SP) (Chen et al., 2006; Chen et al., 2005). Mediante RT-PCR demostraron que estas células eran positivas para los marcadores de células madre *Sca1*, *Oct4*, *Nanog*, *Nestin*, *CD133* y *Bmi-1* que son marcadores de células madre adultas hematopoyéticas. También expresan factores esenciales para el desarrollo de la hipófisis o componentes de las vías de señalización de *Notch*, *Wnt* y *Shh*, involucradas en la regulación de las células madre, así como en la embriogénesis temprana de la hipófisis. Las SP eran negativas para *Prop-1*, un factor de transcripción indispensable para el desarrollo embrionario de las células del linaje de *Pit-1* (lactotropas, somatotropas y tirotropas). Purificaron a las SP con *Sca1* y las cultivaron como esferoides, y observaron que estos esferoides conservaban las mismas características que las células SP aisladas y eran capaces de ser pasadas durante dos generaciones. También observaron que las poblaciones de células SP contenían una pequeña proporción de células foliculoesteladas positivas para AMCA. Estos resultados proponen a las células SP como posibles células madre

de la hipófisis, sin embargo, no demostraron su capacidad de auto-renovación infinita y el carácter pluripotente característico de las células madre.

Posteriormente, el grupo de Robinson describe la expresión de SOX2, un marcador de células madre embrionarias, en la hipófisis embrionaria y adulta de ratón (Fauquier et al., 2008). Demuestran mediante inmunofluorescencia que SOX2 se expresa tanto en la zona marginal como en grupos dispersos por la adenohipófisis. Estas células también *in vivo* eran positivas para S100, E-cadherina y SOX9 aunque había células SOX2+ que no expresaban ni S100 ni SOX9. Cuando dispersaron las células de la adenohipófisis y las cultivaron *in vitro*, estas crecían como esferoides y observaron que las células SOX2+ eran E-cadherina+, S100- y SOX9-. Cuando los esferoides se iban diferenciando empezaban a expresar S100 y SOX9 nuclear. También demostraron que eran capaces de diferenciar los esferoides a los diferentes linajes de células productoras de hormonas hipofisarias. En este trabajo sugieren que las población de células SOX2+/SOX9+ eran células de amplificación transitoria, mientras que las células SOX2+/SOX9- eran las células madre progenitoras. Sin embargo en este trabajo no purifican las dos poblaciones de células SOX2+ que describen.

Otro trabajo realizado por Gleiberman (Gleiberman et al., 2008) ha descrito una población de células en la zona marginal de la hipófisis nestin + utilizando ratones transgénicos que expresaban la proteína verde fluorescente GFP regulada por un fragmento del promotor de nestin, para caracterizar las posibles células madre hipofisarias. Describen una población de células nestin+ con capacidad de auto-renovación *in vitro* y que aparentemente son capaces de diferenciarse a los tipos celulares de la hipófisis tanto *in vitro* como *in vivo* (ver más adelante, apartado 5.4). Sin embargo el problema de este modelo surge al

analizar las células GFP+, ya que no analizaron la expresión endógena del gen de nestin en la hipófisis y asumieron que todas las células GFP+ eran nestín+.

5.3.2.- Las células GPS (GFRa2+/PROP+/STEM CELL+ (SOX2, SOX9, OCT4) forman un nicho de células madre en la hipófisis en rata, ratón y humanos

En el apartado anterior hemos descrito distintas poblaciones celulares propuestas por diferentes grupos como células madre de la hipófisis. Con el trabajo realizado en esta tesis pretendemos contribuir sustancialmente a esclarecer la presencia de un nicho de células madre en la hipófisis, tanto en roedores como en humanos.

Las células madre adultas se dividen con poca frecuencia y residen en áreas protegidas, microambientes o nichos (Ehninger and Trumpp, 2011; Xie and Li, 2007; Li et al., 2008). Los nichos de células madre se definen como microambientes celulares y moleculares que regulan la función de las células madre, esto incluye el control del equilibrio entre la auto-renovación y la diferenciación, así como la participación en respuestas específicas al estrés. Los nichos además están formados por diferentes tipos de células, unas proporcionan un lugar de protección a las células madre, y otras secretan factores que las mantienen en un estado de reposo característico de las células madre que hace que presenten una baja tasa de reducción de telómeros a lo largo de su vida. Nuestros resultados muestran la existencia de un nicho organizado de células primordiales en la hipófisis de rata, ratón y de seres humanos, localizado principalmente en la zona marginal de la hipófisis (MZ) en el caso de rata y ratón y alrededor de las

reminiscencias de la hendidura de Rathke, homólogas a la zona marginal de las hipófisis de rata y ratón, en seres humanos.

El nicho de células GPS se caracteriza por expresar el co-receptor GFRa2, así como el co-receptor GFRa3. Estas células expresan también marcadores de células madre tales como OCT4, SSEA4, KLF4, miembros de la familia de factores de transcripción Sox, SOX2 y SOX9 y el factor de transcripción específico de hipófisis Prop1, y el receptor RET. Por otra parte, encontramos una positividad relativa para los marcadores S-100 y vimentina, pero eran claramente negativas para Nanog, Nestin y las hormonas hipofisarias. Las células GPS además sobreexpresan E-cadherina, b-catenina, citoqueratinas.

Vimentina, es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto, en particular en células embrionarias, ciertas células endoteliales, así como en las células sanguíneas. La sobreexpresión de vimentina está relacionada con células en un estadio indiferenciado y se usa como marcador de células madre mesenquimales. Los resultados obtenidos en el momento de la realización de esta tesis, usando un anticuerpo policlonal de vimentina muestran que la presencia de células vimentina+ cerca de las células de GPS en la hipófisis de roedores y en la hipófisis humana, sugiere la presencia de un nicho de células madre en la hipófisis. Recientemente realizamos inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias de vimentina con un anticuerpo monoclonal (datos no publicados), y observamos que las células GPS sobreexpresan vimentina. El hecho de que las células GPS además de sobreexpresar vimentina, también sobreexpresen E-cadherina y citoqueratinas, podría indicar que las células GPS forman un nicho de células madre indiferenciadas capaces de autorrenovarse o de diferenciarse hacia los tipos celulares especializados de la hipófisis. Que las

células GPS sean propensas a someterse a estos cambios de autorrenovación/diferenciación es lo que se conoce como plasticidad fenotípica, característica de las células madre adultas.

Las células epitelio-mesenquimales de transición (EMT) representan un estadio por el cual pasan las células tumorales para adquirir características malignas, tales como agresividad, supervivencia y motilidad, por esta razón algunos autores proponen a las células EMT como células madre cancerosas. Las células EMT se caracterizan por la expresión de Vimentina, y pérdida de la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina y citoqueratinas, lo que permite que las células puedan proliferar y migrar libremente, debido a la pérdida de las uniones intracelulares. Lo que todavía no se conoce son las vías por las cuales estas células comienzan a proliferar y migrar, aunque se sabe que este proceso está altamente controlado por el nicho que rodea a las células madre (Sarrío et al., 2008).

Recientemente hemos detectado los marcadores específicos de las células madre en craneofaringiomas (CRF), un tumor potencialmente derivado de restos de la bolsa de Rathke. Hicimos estudios de mRNA, western blot, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, en secciones de hipófisis normales de rata y humanos, y en craneofaringiomas. Detectamos que tanto en la hipófisis normal como en los craneofaringiomas, las células GPS expresaban los marcadores característicos que las definen: GFRa2+/PROP+/STEM CELL+ (SOX2, SOX9, OCT4), así como KLF4 y sobreexpresión de b-catenina. Sin embargo, mientras que la hipófisis normal, expresión del receptor RET y sus co-receptores GFRa2 y GFRa3 co-localizaban, en los craneofaringiomas la expresión de RET y GFRa3 estaba alterada: en un 75% no se detectaba su expresión, y en un

25% detectaba la expresión de ambos marcadores pero no co-localizaban en la misma célula. La falta de señal o deslocalización en los craneofaringiomas del sistema RET/GFRa, podría estar relacionado con la ubicación incorrecta de las células GPS o con el crecimiento celular desregulado de estas en los craneofaringiomas (Garcia-Lavandeira et al., 2012).

Que los marcadores de células madre/progenitoras en las células GPS, no estuvieran alterados en los craneofaringiomas, sugiere un origen común para las células GPS, apoyando nuestra teoría de que las células GPS forman un nicho de células madre en la hipófisis tanto en roedores como en humanos.

5.3.3.- Capacidad de las células GPS para formar esferoides y diferenciarse *in vitro*

La formación de esferoides constituye un hecho clave en la caracterización de las células madre.

Cuando aislamos y purificamos las células GFRa2+ (GPS) del resto de células de la hipófisis y las cultivamos sin sustrato y en medio carente de suero, con aditivos para el crecimiento de células madre como, N2 y B27 las células GPS crecían como esferoides. Estos esferoides formados a partir de las células son móviles y presentan cilios móviles en un polo. Esto no es sorprendente teniendo en cuenta las características de las células a partir de las cuales se originan, pues uno de los papeles de la polaridad planar en la embriogénesis, inducido por la b-catenina submembrana, es la formación de cilios orientados durante la migración morfogénica. Los esferoides mantenían la expresión de

GFRA2, así como Prop1, OCT4 y E-cadherina, pero eran negativos con respecto a la expresión de marcadores de diferenciación como las hormonas hipofisarias.

Cuando inducimos la diferenciación a nuestros esferoides, son capaces de diferenciarse para dar células secretoras hipofisarias, pero también hacia fenotipos similares a los de las neuronas (a células positivas para beta-tubulina III, y neurofilamento, proteínas características de neuronas). Este hallazgo no es contrario al conocimiento previo del origen o el comportamiento de las células de la hipófisis. Tanto la hipófisis (bolsa de Rathke Primordial) como el cerebro (tubo neural encefálico) derivan de una masa común de células ectodérmicas embrionarias, llamado ectodermo anterior que da lugar a la cara y a la cabeza (Zhu et al., 2007). Del mismo modo *in vitro* se obtienen de los progenitores neuronales fetales, células secretoras hipofisarias de GH y Prolactina (U et al., 2002) y también se ha demostrado la inducción del fenotipo neuronal de las células madre epiteliales del oído (Li et al., 2003). Además, existen hallazgos patológicos de muchos adenomas hipofisarios humanos en los que se encuentra una metaplasia neuronal (Gossard et al., 1987; Yoshizato et al., 1998; Harvey et al., 2006).

La tabla 1 muestra la composición de factores de crecimiento, hormonas y otros compuestos que forman los diferentes medios de diferenciación, así como los tipos celulares obtenidos con cada medio. Dependiendo del medio de diferenciación utilizado, somos capaces de diferenciar las células GPS a distintos tipos celulares, bien células que producen al menos una hormona hipofisaria concreta o bien células con fenotipo de neuronas. La eficiencia es baja en la mayor parte de los experimentos, pero esto es algo común en las múltiples publicaciones de otros grupos que intentan diferenciar células madre.

Tabla 1: Componentes hormonales y otros factores presentes en los medios de diferenciación DifM.

Componentes/medio diferenciación	DifM1	DifM2	DifM3	DifM4
FBS	10%	5%	1%	
BSA	1 g/L		2 g/L	
GLUCAGON	5 µg/L		10 µg/L	
FGF	0,1 µg/L		0,2 µg/L	0,5 µg/L
EGF	0,05 µg/L		0,1 µg/L	
HIDROCORTISONA	71,5 µg/L		143 µg/L	0,0046 mg/L
T3	0,2 mg/L		0,4 mg/L	0,002 mg/L
CORTICOSTERONA				0,02 mg/L
PROGESTERONA		0,0063 mg/L	0,0063 mg/L	0,0063 mg/L
RETINOL				0,1 mg/L
ACETATO RETINOL				0,1 mg/L
INSULINA		5 mg/L	5 mg/L	14 mg/L
PUTRESCINA		16,1 mg/L	16,1 mg/L	16,1 mg/L
TRANSFERRINA	5 mg/L	100 mg/L	101 mg/L	10 mg/L
GHRH				0,0016 mg/L
GHRELIN				0,0033 mg/L
SOMATOSTATINA				10 µg/L
TIPOS CELULARES OBTENIDOS				
GH	n.t	Si	No	Si
TSH	No	Si	No	Si
ACTH	Si	Si	n.t	n.t
FSH	n.t	Si	n.t	n.t
PRL	n.t	No	Si	No
Fenotipo de Neurona	n.t	n.t	n.t	Si

En el proceso de diferenciación *in vitro*, obtuvimos distintos tipos celulares dependiendo del tipo de sustrato (poli-L-lisina o colágeno tipo IV) y del tipo de medio de diferenciación utilizado DifM 1-5. Así, con el medio DifM1 obtuvimos el 39% de células de ACTH, y el 0% de TSH posiblemente por los factores del suero. Con el medio DifM2 obtuvimos 10% de GH, 48% de TSH, 7% de ACTH y 7% de FSH pero ninguna célula de Prolactina, posiblemente por los factores del suero y por la presencia de Insulina en el medio que se sabe que es un inductor de diferenciación. Con el medio DifM3 obtuvimos 37% de células de Prolactina y no de GH y TSH, posiblemente por la presencia en el medio, entre otros factores, de EGF. Con el medio DifM4 obtuvimos 9,5% de GH y 60% de TSH pero no Prolactina, posiblemente porque el medio estaba formado por

Insulina, FGF, T3 y corticoides entre otros factores. Sorprendentemente, con este medio DifM4 también obtuvimos células con aspecto de neuronas y con apariencia bipolar que eran positivas para una proteína característica de los filamentos intermedios neuronales, neurofilamento (NF) en un 1% y para Tubulina-beta-III en un 22%, y negativas para GH, esto podría explicarse porque el medio DifM4 contenía B27 un suplemento desarrollado para la propagación *in vitro* de células nerviosas progenitoras. Con el medio DifM5 solo testamos la diferenciación a células de FSH consiguiendo que el 6% de las células se diferenciase a esta hormona.

Esta capacidad de formar esferoides en cultivo y el potencial que muestran *in vitro* para diferenciarse, dando lugar a cualquiera de las células productoras de hormonas (las llamadas células endocrinas o células hormonales) de la adenohipófisis o de transdiferenciarse a células con fenotipo de neuronas, muestra que las células GPS hipofisarias pueden actuar como progenitores multipotenciales con potencial neuroectodérmico, demostrando la plasticidad fenotípica de las células GPS *in vitro*.

Nuestros resultados también muestran que las células GPS eran capaces de permanecer indiferenciadas cuando las cultivamos en medio condicionado de MEFs; aunque en estas condiciones parte de las células se diferencian espontáneamente con los pases. Una característica compartida por todas las células madre es conseguir mantener su capacidad proliferativa por más de cinco divisiones (Vankelecom and Gremeaux, 2010). Conseguimos que las células GPS permanecieran indiferenciadas, bien formando colonias o como células aisladas, cuando las cultivamos en placas cubiertas con gelatina en StemM, 1% de FBS y ESGRO (LIF). Usando este medio conseguimos mantener las células GPS

indiferenciadas por más de cinco pases, apoyando así nuestra hipótesis de que las células GPS son células madre.

5.4.- NESTIN Y EL NICHOS GPS EN LA HIPÓFISIS

Nestin es una proteína que marca los filamentos intermedios en las células nerviosas, implicadas en el crecimiento radial de los axones. También es un marcador de células madre en varios tipos de tejidos, incluyendo las células madre neuronales adultas y embrionarias (Gilyarov, 2008). También se sabe que nestin se expresa en las células foliculoesteladas (FS), propuestas por varios autores como posibles células madre de la hipófisis (Lepore et al., 2005; Vankelecom, 2007a; Vankelecom, 2007b; Devnath and Inoue 2008).

Recientemente se realizó un estudio con ratones transgénicos que expresan GFP bajo un fragmento del promotor de nestin para seguir las células madre hipofisarias in vivo (Gleiberman et al., 2008). El estudio propone que las células madre de la hipófisis expresan nestin, in vivo. Encontraron células GFP+ en la neurohipófisis, en la zona marginal y dispersas por la adenohipófisis. Cuando realizaron la co-localización con otros marcadores, encontraron co-expresión de nestin en la MZ con EpCAM, proteína transmembrana expresada en la mayoría de las células epiteliales de la hipófisis, y LHX3 un factor de transcripción expresado durante las primeras etapas del desarrollo de la hipófisis y presente en la adenohipófisis después del nacimiento; sin embargo encontraron pocas células nestin+ Sox2+. Estudiaron la expresión de GFP durante el desarrollo de la hipófisis y encontraron un grupo muy pequeño de células nestin+ en la parte dorsal de la bolsa de Rathke en el día 11.5 de desarrollo embrionario. Con el fin de rastrear las células nestin+ (GFP+) en la hipófisis, cruzaron el ratón

transgénico nestin-Cre recombinasa, donde el promotor de nestin induce la expresión de la CRE recombinasa, con un ratón ROSA-lsl-GFP. Así pues, cualquier célula que exprese nestin en cualquier momento de su historia biológica expresaría CRE, y pasaría a ser permanente GFP +. Sorprendentemente, en ratones recién nacidos, se detectaron muchas células GFP + en el cerebro, y pocas en la neurohipófisis, el lóbulo intermedio y dispersas en la adenohipófisis. Cuando estudiaron ratones de 5 meses de edad, la neurohipófisis fue toda GFP +, algunas células dispersas a través del lóbulo intermedio y de un 15-20% de las células de la adenohipófisis resultaron GFP+. Estos autores proponen que las células madre nestin+ no desempeñan un papel importante en la organogénesis de la hipófisis, en cambio en la etapa postnatal, empezarían a producir un linaje de células diferenciadas distinto de los precursores embrionarios, distinguiendo de esta forma dos subconjuntos fenotípicamente similares de células endocrinas con dos orígenes distintos, unas de origen embrionario y otras originadas, después del nacimiento, a partir de las supuestas células madre nestin+ GFP+.

A pesar de demostrar que las células que expresaban GFP contribuían a cada linaje endocrino, en este trabajo no realizaron el control del ratón transgénico nestin-GFP, y asumieron que todas las células GFP+ eran nestin+, sin tener en cuenta que el gen de nestin se expresa de forma endógena en la hipófisis y que estos animales presentan un hipopituitarismo, cuya sintomatología a menudo produce una amplia gama de síntomas que pueden influir en la actividad del transgen. Por esta razón recientemente se ha publicado otro trabajo en el que han examinado la actividad del transgen netin-GFP y observaron que al contrario de lo publicado por Gleiberman, que las células GFP+ no coincidían con las células nestin+ por inmunofluorescencia. Que las células GFP/nestin+ no se encontraban en la zona marginal de la bolsa de Rathke y que tampoco presentaban ninguna

actividad significativa en la contribución del mantenimiento de la hipófisis después del nacimiento (Galichet et al., 2010). Por esta razón sugieren que es poco probable que las células nestin⁺ sean las células madre de la hipófisis ya que el ratón Nestin-Cre de Gleiberman no era el más eficiente en el control de la expresión de Cre, bajo el promotor de nestin.

Nuestros resultados concuerdan con el este último trabajo realizado por Rizzoti, ya que aunque hemos encontrado células nestin⁺ en la neurohipófisis, esparcidas a través de la adenohipófisis y unas pocas en contacto con el nicho GPS, no hemos podido encontrar la co-expresión de nestin con marcadores de GPS, lo que nos permite sugerir, al igual que otros autores, que es poco probable que las células nestin⁺ sean células madre en la hipófisis.

5.5.- PROP-1 Y b-CATENINA EN LA HIPÓFISIS

Existen muchos trabajos que relacionan las células que sobreexpresan los marcadores de filamentos intermedios como E-cadherina, y a la beta-catenina, con las células madre, ya sea durante el desarrollo embrionario o con células madre adultas. La vía canónica de Wnt / FZ / E-cadherina / b-catenina, donde b-catenina pasa del citoplasma al núcleo y es necesaria para mantener la pluripotencialidad de las células madre embrionarias con CBP como co-activador génico, así como en el inicio de la morfogénesis del epitelio y el establecimiento de uniones adherentes a través de las células progenitoras, con menor capacidad proliferativa, utilizando p300 como co-activador (Miyabayashi et al., 2007; Wrobel et al., 2007; Karpowicz et al., 2009; Lai et al., 2009; Zhang et al., 2010).

La b-catenina es una proteína que interviene en dos procesos totalmente distintos, participa en la adhesión celular y en la señalización nuclear. Cuando funciona como una proteína estructural que conecta las células entre sí, b-catenina citoplasmática se une a E-cadherina que forma parte de las uniones entre células vecinas, y a su vez se une a la alpha-catenina, que se unen a los filamentos de actina del citoesqueleto. Cuando actúa como coactivador transcripcional, la b-catenina citoplasmática que no está unida a la actina se une a dos factores de transcripción (los llamados TCF y LEF) que resultan activados y se transloca al núcleo, determinando así la transcripción de una serie de genes específicos (fig.3).

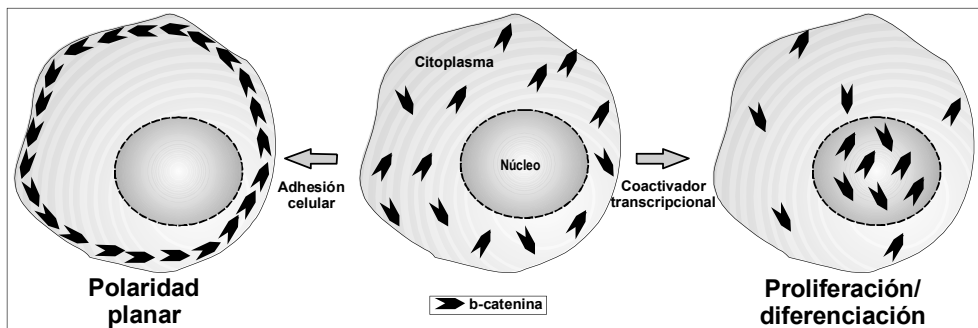


Fig. 3.- **Funciones de b-catenina en la célula.** La b-catenina citoplasmática participa tanto en la adhesión celular como en la señalización nuclear.

Nuestros resultados demuestran que en la línea de células madre GPS, la expresión de GFRA2 coincide con la expresión de b-catenina, pero con unas delimitaciones muy precisas. La b-catenina en las células GPS se dispone en forma de anillos subcelulares submembranosos, lo que nos sugería que la vía de Wnt no está activa en las células GPS, ya que no encontramos b-catenina nuclear.

Por lo que podríamos decir que en nuestras células la función de b-catenina estaría relacionada con el mantenimiento de la adhesión celular, regulando la capacidad proliferativa de las células GPS, manteniéndolas en reposo hasta que sea necesaria su diferenciación a los distintos linajes hipofisarios.

La señalización de la vía canónica de Wnt (b-catenina nuclear) siempre se ha relacionado con el mantenimiento de la auto-renovación de las células madre embrionarias de ratón y humanas, sin embargo, que sea indispensable para el mantenimiento de la auto-renovación todavía no está claro. La localización nuclear de b-catenina se ha demostrado en las células madre embrionarias de ratón, pero nosotros y otros autores, no creemos que esta función a través de la vía de Wnt sea realmente significativa en el mantenimiento de la auto-renovación de las células madre. Mediante la generación de un ratón deficiente en b-catenina (*Ctnnb1*^{-/-}) Lyashenko y colaboradores demostraron *in vitro*, que la auto-renovación de las células madre embrionarias se mantenía en ausencia de b-catenina, pues las células madre que procedían de este ratón eran capaces de auto-renovarse y expresaban los marcadores de células madre embrionarios. Cuando diferenciaban las células madre embrionarias, del tipo salvaje, estas originaban las tres capas germinales, mientras que las que procedían del *Ctnnb1*^{-/-}, no eran capaces de formar la capa germinal de endodermo ni promover la diferenciación neuronal. Pero cuando rescataban la expresión de b-catenina, mediante el uso de b-catenina mutada que presentaba una señalización defectuosa para TCF/LEF (nuclear) pero mantenía intacta la expresión de la b-catenina cortical, se restablecía la adhesión celular mediada por cadherina, y las células madre se diferenciaban en endodermo y generaban neuroepitelio correctamente, lo que indicaba que la función de adhesión celular de la membrana regulada por la b-catenina cortical, es más importante en el proceso de diferenciación (división

asimétrica) que en el mantenimiento de la auto-renovación de las célula madre (Lyashenko et al., 2011).

Por lo tanto, en las células madre GPS la localización citoplasmática de b-catenina, puede estar manteniendo el balance entre células progenitoras y diferenciadas, controlando la correcta diferenciación de las células madre a los distintos linajes celulares de la hipófisis en el momento que sean necesarios (pubertad, hipotiroidismo etc.).

Uno de los factores de transcripción esenciales durante el desarrollo embrionario de la bolsa de Rathke en la hipófisis es Prop-1. En la bolsa de Rathke, la transición de la proliferación de células progenitoras en células diferenciadas productoras de hormonas, está cuidadosamente regulada. La señalización de Notch, Hesx1 y Prop1, es necesaria para mantener las células progenitoras en la bolsa de Rathke y generar células diferenciadas de la adenohipófisis. Prop1, participa en la transición de las células progenitores proliferantes a células que se diferencian y permanecen en reposo; Prop1 activa la expresión de Notch2, y la señalización de Notch retroalimenta para mantener y / o aumentar la expresión de Prop1 (Monahan et al., 2009; Himes et al., 2009). Los ratones enanos Ames, presentan una mutación recesiva en el gen *Prop-1 (df)*. En estos ratones Prop1 deficientes, las células se encuentran atrapadas en la bolsa de Rathke, y hay muchas menos células progenitoras proliferantes en la adenohipófisis, después del nacimiento. Esto sugiere que Prop1 es necesario para la migración de las células progenitoras en la adenohipófisis (Himes et al., 2009).

En la hipófisis normal, se pensaba que después del nacimiento Prop1 no se necesitaba más y estaba completamente silenciado. Nuestros resultados

demuestran que en la hipófisis de ratas adultas Prop1 se co-expresa en la estrecha línea de células que expresan GFRA2 y b-catenina, es decir, Prop1 se expresa en las células GPS de la hipófisis adulta.

Se sabe que la vía Wnt/b-catenina se requiere durante el desarrollo de la hipófisis para la determinación del linaje de Pit1 (tirotropas, somatotropas y lactotropas), pero no es necesario para la diferenciación de todos los tipos celulares de la hipófisis. La interacción directa entre b-catenina y el factor de transcripción específico de la hipófisis Prop1, inicia el mecanismo de activación de la transcripción del gen Pit1. Mediante estudios genéticos y bioquímicos, usando ratones transgénicos, deficientes en b-catenina, o mutantes para Prop1 han demostrado que b-catenina interacciona directamente con Prop1, siendo un coregulador necesario para la actividad de la transcripción Prop1, provocando la activación inicial del factor de transcripción Pit1 que regula la diferenciación de las células somatotropas, tirotropas y lactotropas (Olson et al., 2006).

Nuestros datos demuestran que la expresión de Prop1 en la hipófisis adulta está restringida al nicho de células GPS, al igual que la sobre expresión de b-catenina, lo que nos podría permitir especular sobre un papel de Prop1 como protector de la proliferación de las células madre, guiándolas correctamente en las divisiones asimétricas (diferenciación), a través de la vía Wnt/b-catenina.

5.6.- ESTUDIO DE LAS CÉLULAS GPS EN UN MODELO DE HIPOPITUITARISMO

Las células GPS podrían tener diferentes utilidades, derivadas de los importantes papeles que presentan en las células progenitoras de los diferentes

órganos de los seres humanos. Algunos de los genes expresados por ellas, como SOX2 cuyas mutaciones pueden causar hipoplasia hipofisaria asociada a hipogonadismo hipogonadotrófico (Fantes et al., 2003; Kelberman et al., 2006). También es importante la expresión del gen PROP-1, factor de transcripción conocido por su expresión exclusiva durante el desarrollo de la hipófisis. Mutaciones en PROP-1 son responsables del hipopituitarismo por síndrome de CPHD (Combined Pituitary Hormone Deficiency) (Ward et al., 2005). Los pacientes con CPHD muestran una pérdida general de todos los tipos de células secretoras, afectando en mayor medida a las que son necesarios durante todo el crecimiento y la pubertad (GH, LH / FSH), las que afectan al metabolismo de la tiroides (TSH) y, aunque al principio puede parecer que no está presente, la deficiencia de ACTH también acaba apareciendo (Bottner et al., 2004).

Tanto los ratones con enanismo de Snell, que presentan una mutación puntual en el gen *Pit-1*, que genera un fenotipo caracterizado por la pérdida de las células secretoras dependientes de Pit1 (GH, PRL, TSH) y no de las células gonadotropas y corticotropas (Quentien et al., 2006), así como los ratones que carecen de Prop1 (ratones con enanismo de Ames) (Andersen et al., 1995; Sornson et al., 1996), que muestran un fenotipo similar al CPHD humano, en particular en la deficiencia en gonadotropas (Nasonkin et al., 2004), tienen un volumen hipofisario normal en el momento del nacimiento, pero el órgano no crece ni se diferencia durante la vida postnatal, de forma similar al fenotipo de CPHD en seres humanos. Los ratones transgénicos para Prop1 además tienen un retraso en la pubertad, lo que sugiere un defecto en la homeostasis del adulto. Si como demuestran nuestros resultados la expresión de Prop1 en la hipófisis del adulto está restringida al nicho de las células GPS, podríamos sugerir que la

desregulación de las células GPS podría tener consecuencias importantes en la homeostasis de la hipófisis en la etapa adulta.

La deficiencia hipofisaria inducida por mutaciones en *Prop1* tiene similitudes con el hipopituitarismo inducido mediante la inactivación del regulador del ciclo celular *Cdk4* en los ratones nulos para *Cdk4*. *Cdk4* es necesario para que las células madre puedan dividirse y diferenciarse correctamente. *Cdk4* disminuye cuando la célula madre entra en un estado denominado “transit amplifying” (progenitora), en el cual la célula presenta un estado de proliferación limitado y se considera que entra en un paso inicial para la diferenciación final tras esa proliferación (Horsley et al., 2008).

Los ratones deficientes en *Cdk4* muestran una hipófisis hipoplásica, mucho más pequeña que la hipófisis del ratón normal, con una disminución dramática de todas las células secretoras de hormonas de la adenohipófisis durante la vida postnatal. Nuestros resultados muestran que curiosamente el porcentaje de células GPS se incrementa en la hipófisis de estos ratones con respecto a las hipófisis normales. Esto podría sugerir que en los ratones deficientes en *Cdk4* las células madre progenitoras son capaces de proliferar pero no de diferenciarse a los distintos tipos de células secretoras productoras de hormonas de la adenohipófisis. Así pues, también demostramos que cuando realizamos el rescate del *Cdk4* nulo mediante un *Cdk4* mutado, permanentemente activo, no sólo aumentó el número de células diferenciadas sino también el tamaño total de la adenohipófisis, disminuyendo el número de células GPS.

Todos estos datos indican que las células GPS, así como las células derivadas de ellas, podrían ser útiles en el estudio de enfermedades como el

hipopituitarismo. Parece razonable que la hipófisis deba tener un control estricto sobre los mecanismos de diferenciación y proliferación para asegurar el funcionamiento apropiado de procesos corporales importantes (metabolismo, crecimiento, pubertad o reproducción). El nicho de células GPS descrito en nuestro trabajo, puede tener contribuciones relevantes en la homeostasis postnatal de la hipófisis. La alteración del control proliferativo de las células GPS mediante mutaciones específicas de pérdida de función (carencia de *Prop1* o carencia de *Cdk4*), da como resultado una disminución de la proliferación y enfermedad hipoplásica.

Estos hallazgos sugieren que las células GPS forman un nicho de células madre adultas con relevancia funcional en la expansión fisiológica de la glándula hipofisaria a lo largo de la vida, así como en la protección contra las enfermedades de la hipófisis.

5.7.- LAS CÉLULAS GPS: ¿CÉLULAS MADRE Ó PROGENITORAS?

Una célula madre es una célula que tiene la capacidad de auto-renovarse mediante división mitótica simétrica o bien de continuar la vía de diferenciación para la que está programada y, por lo tanto, producir por división asimétrica células de uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de multipotencialidad. Estas células tienen la capacidad de dividirse sin perder sus propiedades y pueden diferenciarse en otras células. La mayoría de los tejidos de un individuo adulto poseen una población específica propia de células madre que permiten su renovación periódica o su regeneración

cuando se produce algún daño tisular. Algunas células madre adultas son capaces de diferenciarse en más de un tipo celular como las células madre mesenquimales y las células madre hematopoyéticas, mientras que otras son precursoras directas de las células del tejido en el que se encuentran, como por ejemplo las células madre de la piel o las células madre gonadales (células madre germinales, SSC).

Las células madre embrionarias son aquellas que forman parte de la masa celular interna de un embrión de 4-5 días de edad. Éstas son pluripotentes lo cual significa que pueden dar origen a las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Una característica fundamental de las células madre embrionarias es que pueden mantenerse (en el embrión o en determinadas condiciones de cultivo) de forma indefinida, formando al dividirse una célula idéntica a ellas mismas, y manteniendo una población estable de células madre. Son células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades.

Las células madre adultas son células no diferenciadas, con características similares a las células madre embrionarias, que se encuentran en tejidos y órganos adultos y que poseen la capacidad de diferenciarse para dar lugar a células diferenciadas del tejido en el que se encuentran. En un individuo adulto se conocen hasta ahora alrededor de 20 tipos distintos de células madre, que son las encargadas de regenerar tejidos en continuo desgaste (como la piel o la sangre) o dañados (como el hígado). Su capacidad es más limitada para generar células especializadas. Las células madre hematopoyéticas de médula ósea (encargadas de la formación de la sangre) son las más conocidas y empleadas en la clínica desde hace tiempo. En la misma médula, aunque también en sangre del cordón umbilical, en sangre periférica y en la grasa corporal se ha encontrado otro tipo de

célula madre, denominadas células madre mesenquimales (MSC) que pueden diferenciarse en numerosos tipos de células de los tres derivados embrionarios (musculares, vasculares, nerviosas, hematopoyéticas, óseas, etc.). Aunque aún no se ha podido determinar su relevancia fisiológica se están realizando abundantes ensayos clínicos para sustituir tejidos dañados (corazón, articulaciones) por derivados de estas células.

En nuestro trabajo hemos caracterizado tanto en la hipófisis de roedores como humana las células GPS, las cuales proponemos como células madre de la hipófisis.

Hemos observado que las células madre GPS co-expresan tanto marcadores de células madre embrionarios como OCT4, SSEA4, SOX2, SOX9 y KLF4, así como el marcador específico de hipófisis del desarrollo embrionario PROP1. Además fuimos capaces de cultivarlas como esferoides y diferenciarlas a los distintos linajes hipofisarios en medio sin suero, aunque no fuimos capaces de amplificar estos esferoides más de dos pases. Por esta razón, el grupo de Rizzotti o de Vankelecom consideran que las GPS no son verdaderas células madre sino solo progenitoras, ya que no pueden dividirse indefinidamente y ésta es una característica intrínseca de las verdaderas células madres. Sin embargo, nuestros estudios demuestran que las células GPS *in vivo* prácticamente no se dividen y la división /proliferación es una característica intrínseca de las células progenitoras. Además solos las células GPS tienen unos telómeros larguísimos por telomapping, algo característico de células madre y no de progenitoras. También hemos demostrado *in vivo* que en el ratón KO para Cdk4, un modelo de ratón con hipopituitarismo, el nicho de células GPS era mucho más grueso que normalmente, y gracias al telomapping hemos observado que el KO para Cdk4

tiene un acumulo de células GPS con telómeros largos que no pueden salir del nicho.

Es cierto que para poder decir que las células GPS son las verdaderas células madre pluripotentes de la hipófisis nos faltaría demostrar:

- 1.- Su capacidad de renovación indefinida.
- 2.- Su capacidad multipotente para diferenciarse en células de mesodermo, ectodermo y endodermo tanto *in vitro* como *in vivo*.

En nuestros recientes resultados (no publicados) hemos conseguido cultivarlas *in vitro*, como una línea celular, durante más de 5 pases en presencia de suero, con ESGRO (LIF) y dos inhibidores. Mediante PCR observamos que presentaban los marcadores característicos de células madre, pero todavía no las hemos diferenciado *in vitro*, ni hemos realizado ensayos *in vivo*, para poder analizar tanto su potencial de diferenciación a las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo), ni tampoco ensayos de reposición para analizar su potencial para formar estructuras de la hipófisis.

Por tanto nuestros hallazgos nos permiten sugerir que las células GPS forman un nicho de células madre adultas tanto en la hipófisis de roedores como de humanos, que se diferencian de las otras células de la hipófisis por no expresar proteínas específicas de esta glándula pero sí marcadores bien establecidos de células madre.

6.- Conclusiones

6.- CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1.- Demostramos por primera vez la localización y caracterización de las células madre hipofisarias. Estas células expresan específicamente el co-receptor GFRA2. Utilizando GFRA2 y otros marcadores hemos demostrado la localización de las células GFRA2 positivas en la zona marginal de la hipófisis de roedores y humanos.

2.- Las células GFRA2 positivas expresan un marcador específico del desarrollo embrionario de la hipófisis, PROP-1 y a su vez co-expresan marcadores de células madre (o Stem cells) como SOX2, SOX9 y OCT4. Por tanto, las hemos denominado células GPS (G: GFRA2+, P: Prop1+, S: Stem+, Oct4, Sox2 y Sox9). Estas células expresan también GFRA3 y KLF4.

3.- Caracterizamos un nicho de células madre compuesto por dos líneas de células. La línea de células más anterior, las células GPS (G: GFRA2+, P: Prop1+, S: Stem+, Oct4, Sox2 y Sox9), o células madre de la hipófisis, y otra línea de células contiguas a las anteriores, positivas para Vimentina, un marcador de células madre, que podrían tener la función de células sustentadoras del nicho.

4.- Las células GPS tienen los telómeros largos y retienen BrdU en la hipófisis adulta lo que sugiere que se dividen con menor frecuencia, un rasgo distintivo de las células madre/progenitoras.

5.- Las células GPS (G: GFRA2+, P: Prop1+, S: Stem+, Oct4, Sox2 y Sox9) aisladas y cultivadas in vitro, tienen la capacidad de formar esferoides en ausencia de suero, conservan los marcadores stem y tienen movimiento por cilios. Los esferoides inducidos a diferenciarse son capaces de formar todos los tipos de células secretoras hipofisarias y también neuronas.

6.- El bloqueo de la proliferación asimétrica de células GPS en el ratón nulo para Cdk4 causa hipopituitarismo.

7.- Bibliografía

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Airaksinen, M.S., and Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 383-394.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* 227, 271-278.
- Andersen, B., Pearse, R.V., 2nd, Jenne, K., Sornson, M., Lin, S.C., Bartke, A., and Rosenfeld, M.G. (1995). The Ames dwarf gene is required for Pit-1 gene activation. *Dev. Biol.* 172, 495-503.
- Arighi, E., Borrello, M.G., and Sariola, H. (2005). RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 441-467.
- Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T.C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T., and Adjaye, J. (2007). Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 500-510.
- Braydich-Stolle, L., Kostereva, N., Dym, M., and Hofmann, M.C. (2007). Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Dev. Biol.* 304, 34-45.
- Brazelton, T.R., and Blau, H.M. (2005). Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo. *Stem Cells* 23, 1251-1265.
- Bottner, A., Keller, E., Kratzsch, J., Stobbe, H., Weigel, J.F., Keller, A., Hirsch, W., Kiess, W., Blum, W.F., and Pfaffle, R.W. (2004). PROP1 mutations cause progressive deterioration of anterior pituitary function including adrenal insufficiency: a longitudinal analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5256-5265.
- Canibano, C., Rodriguez, N.L., Saez, C., Tovar, S., Garcia-Lavandeira, M., Borrello, M.G., Vidal, A., Costantini, F., Japon, M., Dieguez, C., and Alvarez, C.V. (2007). The dependence receptor Ret induces apoptosis in somatotrophs through a Pit-1/p53 pathway, preventing tumor growth. *EMBO J.* 26, 2015-2028.
- Carpenter, M.K., Rosler, E.S., Fisk, G.J., Brandenberger, R., Ares, X., Miura, T., Lucero, M., and Rao, M.S. (2004). Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev. Dyn.* 229, 243-258.
- Carvalho, L.R., Woods, K.S., Mendonca, B.B., Marcal, N., Zamparini, A.L., Stifani, S., Brickman, J.M., Arnhold, I.J., and Dattani, M.T. (2003). A homozygous mutation in HESX1 is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction. *J. Clin. Invest.* 112, 1192-1201.

- Charbord, P. (2010). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Historical Overview and Concepts. *Hum. Gene Ther.*
- Chen, J., Crabbe, A., Van Duppen, V., and Vankelecom, H. (2006). The notch signaling system is present in the postnatal pituitary: marked expression and regulatory activity in the newly discovered side population. *Mol. Endocrinol.* 20, 3293-3307.
- Chen, J., Hersmus, N., Van Duppen, V., Caesens, P., Deneff, C., and Vankelecom, H. (2005). The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology* 146, 3985-3998.
- Coya, R., Alvarez, C.V., Perez, F., Gianzo, C., and Dieguez, C. (1999). Effects of TGF-beta1 on prolactin synthesis and secretion: an in-vitro study. *J. Neuroendocrinol.* 11, 351-360.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., *et al.* (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell. Stem Cell.* 3, 301-313.
- Dadoune, J.P. (2007). New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem. Cytobiol.* 45, 141-147.
- Deladoey, J., Fluck, C., Buyukgebiz, A., Kuhlmann, B.V., Eble, A., Hindmarsh, P.C., Wu, W., and Mullis, P.E. (1999). "Hot spot" in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1645-1650.
- Devnath, S., and Inoue, K. (2008). An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J. Neuroendocrinol.* 20, 687-691.
- Diaz-Rodriguez, E., Garcia-Lavandeira, M., Perez-Romero, S., Senra, A., Canibano, C., Palmero, I., Borrello, M., Dieguez, C., and Alvarez, C.V. (2011). Direct promoter induction of p19Arf by Pit-1 explains the dependence receptor RET/Pit-1/p53-induced apoptosis in the pituitary somatotroph cells. *Oncogene*
- Dolatshad, N.F., Silva, A.T., and Saffrey, M.J. (2002). Identification of GFR alpha-2 isoforms in myenteric plexus of postnatal and adult rat intestine. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 107, 32-38.
- Duvillie, B., Attali, M., Aiello, V., Quemeneur, E., and Scharfmann, R. (2003). Label-retaining cells in the rat pancreas: location and differentiation potential in vitro. *Diabetes* 52, 2035-2042.
- Ehninger, A., and Trumpp, A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J. Exp. Med.* 208, 421-428.
- Eigenbrot, C., and Gerber, N. (1997). X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9 Å resolution and implications for receptor binding. *Nat. Struct. Biol.* 4, 435-438.

- Fantes, J., Ragge, N.K., Lynch, S.A., McGill, N.I., Collin, J.R., Howard-Peebles, P.N., Hayward, C., Vivian, A.J., Williamson, K., van Heyningen, V., and FitzPatrick, D.R. (2003). Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat. Genet.* 33, 461-463.
- Fauquier, T., Rizzoti, K., Dattani, M., Lovell-Badge, R., and Robinson, I.C. (2008). SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2907-2912.
- Flores, I., Canela, A., Vera, E., Tejera, A., Cotsarelis, G., and Blasco, M.A. (2008). The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev.* 22, 654-667.
- Fuchs, E., Tumber, T., and Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116, 769-778.
- Galichet, C., Lovell-Badge, R., and Rizzoti, K. (2010). Nestin-Cre mice are affected by hypopituitarism, which is not due to significant activity of the transgene in the pituitary gland. *PLoS One* 5, e11443.
- Garcia-Lavandeira, M., Saez, C., Diaz-Rodriguez, E., Perez-Romero, S., Senra, A., Dieguez, C., Japon, M.A., and Alvarez, C.V. (2012). Craniopharyngiomas Express Embryonic Stem Cell Markers (SOX2, OCT4, KLF4, and SOX9) as Pituitary Stem Cells but Do Not Coexpress RET/GFRA3 Receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E80-7.
- Gartner, W., Mineva, I., Daneva, T., Baumgartner-Parzer, S., Niederle, B., Vierhapper, H., Weissel, M., and Wagner, L. (2005). A newly identified RET proto-oncogene polymorphism is found in a high number of endocrine tumor patients. *Hum. Genet.* 117, 143-153.
- Gilyarov, A.V. (2008). Nestin in central nervous system cells. *Neurosci. Behav. Physiol.* 38, 165-169.
- Gleiberman, A.S., Michurina, T., Encinas, J.M., Roig, J.L., Krasnov, P., Balordi, F., Fishell, G., Rosenfeld, M.G., and Enikolopov, G. (2008). Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6332-6337.
- Golden, J.P., DeMaro, J.A., Osborne, P.A., Milbrandt, J., and Johnson, E.M., Jr. (1999). Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Exp. Neurol.* 158, 504-528.
- Gossard, F., Dihl, F., Pelletier, G., Dubois, P.M., and Morel, G. (1987). In situ hybridization to rat brain and pituitary gland of growth hormone cDNA. *Neurosci. Lett.* 79, 251-256.
- Gregorieff, A., Stange, D.E., Kujala, P., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., Peters, P.J., and Clevers, H. (2009). The ets-domain transcription factor Spdef promotes maturation of goblet and paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 137, 1333-45.e1-3.
- Guillou, A., Romano, N., Bonnefont, X., Le Tissier, P., Mollard, P., and Martin, A.O. (2011). Modulation of the tyrosine kinase receptor Ret/glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) signaling: a new player in

- reproduction induced anterior pituitary plasticity? *Endocrinology* 152, 515-525.
- Hagstrom, S.A., Pauer, G.J., Reid, J., Simpson, E., Crowe, S., Maumenee, I.H., and Traboulsi, E.I. (2005). SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies. *Am. J. Med. Genet. A.* 138, 95-98.
- Harvey, S., Baudet, M.L., and Sanders, E.J. (2006). Retinal growth hormone in perinatal and adult rats. *J. Mol. Neurosci.* 28, 257-264.
- He, Z., Jiang, J., Hofmann, M.C., and Dym, M. (2007). Gfra1 Silencing in Mouse Spermatogonial Stem Cells Results in Their Differentiation Via the Inactivation of RET Tyrosine Kinase. *Biol. Reprod.* 77, 723-733.
- He, Z., Jiang, J., Kokkinaki, M., Golestaneh, N., Hofmann, M.C., and Dym, M. (2008). Gdnf upregulates c-Fos transcription via the Ras/Erk1/2 pathway to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation. *Stem Cells* 26, 266-278.
- Heuckeroth, R.O., Enomoto, H., Grider, J.R., Golden, J.P., Hanke, J.A., Jackman, A., Molliver, D.C., Bardgett, M.E., Snider, W.D., Johnson, E.M., Jr, and Milbrandt, J. (1999). Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* 22, 253-263.
- Himburg, H.A., Muramoto, G.G., Daher, P., Meadows, S.K., Russell, J.L., Doan, P., Chi, J.T., Salter, A.B., Lento, W.E., Reya, T., Chao, N.J., and Chute, J.P. (2010). Pleiotrophin regulates the expansion and regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 16, 475-482.
- Himes, A.D., and Raetzman, L.T. (2009). Premature differentiation and aberrant movement of pituitary cells lacking both Hes1 and Prop1. *Dev. Biol.* 325, 151-161.
- Hobbs, R.M., Seandel, M., Falcatori, I., Rafii, S., and Pandolfi, P.P. (2010). Plzf regulates germline progenitor self-renewal by opposing mTORC1. *Cell* 142, 468-479.
- Hofmann, M.C., Braydich-Stolle, L., and Dym, M. (2005). Isolation of male germline stem cells; influence of GDNF. *Dev. Biol.* 279, 114-124.
- Hoffman, L.M., and Carpenter, M.K. (2005). Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 23, 699-708.
- Horsley, V., Aliprantis, A.O., Polak, L., Glimcher, L.H., and Fuchs, E. (2008). NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* 132, 299-310.
- Horvath, E., and Kovacs, K. (2002). Folliculo-stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell? *Ultrastruct. Pathol.* 26, 219-228.
- Iwamoto, T., Taniguchi, M., Asai, N., Ohkusu, K., Nakashima, I., and Takahashi, M. (1993). cDNA cloning of mouse ret proto-oncogene and its sequence similarity to the cadherin superfamily. *Oncogene* 8, 1087-1091.
- Japon, M.A., Urbano, A.G., Saez, C., Segura, D.I., Cerro, A.L., Dieguez, C., and Alvarez, C.V. (2002). Glial-derived neurotropic factor and RET gene

- expression in normal human anterior pituitary cell types and in pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1879-1884.
- Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P.L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., *et al.* (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85, 1113-1124.
- Karpowicz, P., Willaime-Morawek, S., Balenci, L., DeVeale, B., Inoue, T., and van der Kooy, D. (2009). E-Cadherin regulates neural stem cell self-renewal. *J. Neurosci.* 29, 3885-3896.
- Kasper, M., and Karsten, U. (1988). Coexpression of cytokeratin and vimentin in Rathke's cysts of the human pituitary gland. *Cell Tissue Res.* 253, 419-424.
- Kaufman, D.S., Hanson, E.T., Lewis, R.L., Auerbach, R., and Thomson, J.A. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10716-10721.
- Kelberman, D., Rizzoti, K., Avilion, A., Bitner-Glindzicz, M., Cianfarani, S., Collins, J., Chong, W.K., Kirk, J.M., Achermann, J.C., Ross, R., *et al.* (2006). Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 116, 2442-2455.
- Kim, J.A., Kang, Y.J., Park, G., Kim, M., Park, Y.O., Kim, H., Leem, S.H., Chu, I.S., Lee, J.S., Jho, E.H., and Oh, I.H. (2009). Identification of a stroma-mediated Wnt/beta-catenin signal promoting self-renewal of hematopoietic stem cells in the stem cell niche. *Stem Cells* 27, 1318-1329.
- Klein, R.D., Sherman, D., Ho, W.H., Stone, D., Bennett, G.L., Moffat, B., Vandlen, R., Simmons, L., Gu, Q., Hongo, J.A., *et al.* (1997). A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature* 387, 717-721.
- Kotzbauer, P.T., Lampe, P.A., Heuckeroth, R.O., Golden, J.P., Creedon, D.J., Johnson, E.M., Jr, and Milbrandt, J. (1996). Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384, 467-470.
- Krylyshkina, O., Chen, J., Mebis, L., Deneff, C., and Vankelecom, H. (2005). Nestin-immunoreactive cells in rat pituitary are neither hormonal nor typical folliculo-stellate cells. *Endocrinology* 146, 2376-2387.
- Lai, S.L., Chien, A.J., and Moon, R.T. (2009). Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis. *Cell Res.* 19, 532-545.
- Lepore, D.A., Jokubaitis, V.J., Simmons, P.J., Roeszler, K.N., Rossi, R., Bauer, K., and Thomas, P.Q. (2006). A role for angiotensin-converting enzyme in the characterization, enrichment, and proliferation potential of adult murine pituitary colony-forming cells. *Stem Cells* 24, 2382-2390.
- Lepore, D.A., Roeszler, K., Wagner, J., Ross, S.A., Bauer, K., and Thomas, P.Q. (2005). Identification and enrichment of colony-forming cells from the adult murine pituitary. *Exp. Cell Res.* 308, 166-176.
- Li, H., Liu, H., and Heller, S. (2003). Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat. Med.* 9, 1293-1299.

- Li, J., Klein, C., Liang, C., Rauch, R., Kawamura, K., and Hsueh, A.J. (2009). Autocrine regulation of early embryonic development by the artemin-GFRA3 (GDNF family receptor-alpha 3) signaling system in mice. *FEBS Lett.* *583*, 2479-2485.
- Li, X., Perissi, V., Liu, F., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (2002). Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science* *297*, 1180-1183.
- Li, Z., Suzuki, Y., Huang, M., Cao, F., Xie, X., Connolly, A.J., Yang, P.C., and Wu, J.C. (2008). Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects. *Stem Cells* *26*, 864-873.
- Liew, C.G., Moore, H., Ruban, L., Shah, N., Cosgrove, K., Dunne, M., and Andrews, P. (2005). Human embryonic stem cells: possibilities for human cell transplantation. *Ann. Med.* *37*, 521-532.
- Lyashenko, N., Winter, M., Migliorini, D., Biechele, T., Moon, R.T., and Hartmann, C. (2011). Differential requirement for the dual functions of beta-catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 753-761.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., and Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* *118*, 493-504.
- Marin, F., Boya, J., and Lopez-Carbonell, A. (1989). Immunocytochemical localization of vimentin in stellate cells (folliculo-stellate cells) of the rat, cat and rabbit pituitary pars distalis. *Anat. Embryol. (Berl)* *179*, 491-495.
- Martin, J., Hunt, S.L., Dubus, P., Sotillo, R., Nehme-Pelluard, F., Magnuson, M.A., Parlow, A.F., Malumbres, M., Ortega, S., and Barbacid, M. (2003). Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* *22*, 5261-5269.
- Masure, S., Cik, M., Pangalos, M.N., Bonaventure, P., Verhasselt, P., Lesage, A.S., Leysen, J.E., and Gordon, R.D. (1998). Molecular cloning, expression and tissue distribution of glial-cell-line-derived neurotrophic factor family receptor alpha-3 (GFRalpha-3). *Eur. J. Biochem.* *251*, 622-630.
- Melmed, S. (2003). Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J. Clin. Invest.* *112*, 1603-1618.
- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* *466*, 829-834.
- Meng, X., de Rooij, D.G., Westerdahl, K., Saarma, M., and Sariola, H. (2001). Promotion of seminomatous tumors by targeted overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse testis. *Cancer Res.* *61*, 3267-3271.
- Mitsutake, N., Miyagishi, M., Mitsutake, S., Akeno, N., Mesa, C., Jr, Knauf, J.A., Zhang, L., Taira, K., and Fagin, J.A. (2006). BRAF mediates RET/PTC-

- induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: functional support for requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis. *Endocrinology* *147*, 1014-1019.
- Miyabayashi, T., Teo, J.L., Yamamoto, M., McMillan, M., Nguyen, C., and Kahn, M. (2007). Wnt/beta-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 5668-5673.
- Monahan, P., Rybak, S., and Raetzman, L.T. (2009). The notch target gene HES1 regulates cell cycle inhibitor expression in the developing pituitary. *Endocrinology* *150*, 4386-4394.
- Moore, H., Udayashankar, R., and Aflatoonian, B. (2008). Stem cells for reproductive medicine. *Mol. Cell. Endocrinol.* *288*, 104-110.
- Moore, K.A., and Lemischka, I.R. (2006). Stem cells and their niches. *Science* *311*, 1880-1885.
- Nasonkin, I.O., Ward, R.D., Raetzman, L.T., Seasholtz, A.F., Saunders, T.L., Gillespie, P.J., and Camper, S.A. (2004). Pituitary hypoplasia and respiratory distress syndrome in Prop1 knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 2727-2735.
- Naveilhan, P., ElShamy, W.M., and Ernfors, P. (1997). Differential regulation of mRNAs for GDNF and its receptors Ret and GDNFR alpha after sciatic nerve lesion in the mouse. *Eur. J. Neurosci.* *9*, 1450-1460.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* *24*, 372-376.
- Nozaki, C., Asai, N., Murakami, H., Iwashita, T., Iwata, Y., Horibe, K., Klein, R.D., Rosenthal, A., and Takahashi, M. (1998). Calcium-dependent Ret activation by GDNF and neurturin. *Oncogene* *16*, 293-299.
- Oliver, J.A., Maarouf, O., Cheema, F.H., Martens, T.P., and Al-Awqati, Q. (2004). The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J. Clin. Invest.* *114*, 795-804.
- Olson, L.E., Tollkuhn, J., Scafoglio, C., Krones, A., Zhang, J., Ohgi, K.A., Wu, W., Taketo, M.M., Kemler, R., Grosschedl, R., *et al.* (2006). Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. *Cell* *125*, 593-605.
- Otto, C., tom Dieck, S., and Bauer, K. (1996). Dipeptide uptake by adenohipophysial folliculostellate cells. *Am. J. Physiol.* *271*, C210-7.
- Pasini, B., Borrello, M.G., Greco, A., Bongarzone, I., Luo, Y., Mondellini, P., Alberti, L., Miranda, C., Arighi, E., and Bocciardi, R. (1995). Loss of function effect of RET mutations causing Hirschsprung disease. *Nat. Genet.* *10*, 35-40.
- Perry, T.E., Song, M., Despres, D.J., Kim, S.M., San, H., Yu, Z.X., Raghavachari, N., Schnermann, J., Cannon, R.O., 3rd, and Orlic, D. (2009). Bone marrow-derived cells do not repair endothelium in a mouse model of chronic endothelial cell dysfunction. *Cardiovasc. Res.* *84*, 317-325.

- Pevny, L.H., and Lovell-Badge, R. (1997). Sox genes find their feet. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 338-344.
- Plaza-Menacho, I., Burzynski, G.M., de Groot, J.W., Eggen, B.J., and Hofstra, R.M. (2006). Current concepts in RET-related genetics, signaling and therapeutics. *Trends Genet.* 22, 627-636.
- Quartu, M., Serra, M.P., Boi, M., Ferretti, M.T., Lai, M.L., and Del Fiacco, M. (2007). Tissue distribution of Ret, GFRalpha-1, GFRalpha-2 and GFRalpha-3 receptors in the human brainstem at fetal, neonatal and adult age. *Brain Res.* 1173, 36-52.
- Quentien, M.H., Barlier, A., Franc, J.L., Pellegrini, I., Brue, T., and Enjalbert, A. (2006). Pituitary transcription factors: from congenital deficiencies to gene therapy. *J. Neuroendocrinol.* 18, 633-642.
- Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R.V., Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, E.P., and Barbacid, M. (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.* 22, 44-52.
- Reilly, G.C., and Engler, A.J. (2010). Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J. Biomech.* 43, 55-62.
- Richards, M., Fong, C.Y., Chan, W.K., Wong, P.C., and Bongso, A. (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 933-936.
- Robertson, K., and Mason, I. (1997). The GDNF-RET signalling partnership. *Trends Genet.* 13, 1-3.
- Rolletschek, A., Chang, H., Guan, K., Czyz, J., Meyer, M., and Wobus, A.M. (2001). Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors. *Mech. Dev.* 105, 93-104.
- Rosenthal, A. (1998). Specification and survival of dopaminergic neurons in the mammalian midbrain. *Adv. Pharmacol.* 42, 908-911.
- Rosler, E.S., Fisk, G.J., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M.S., and Carpenter, M.K. (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev. Dyn.* 229, 259-274.
- Rossi, J., Herzig, K.H., Voikar, V., Hiltunen, P.H., Segerstrale, M., and Airaksinen, M.S. (2003). Alimentary tract innervation deficits and dysfunction in mice lacking GDNF family receptor alpha2. *J. Clin. Invest.* 112, 707-716.
- Rossi, J., Luukko, K., Poteryaev, D., Laurikainen, A., Sun, Y.F., Laakso, T., Eerikainen, S., Tuominen, R., Lakso, M., Rauvala, H., *et al.* (1999). Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor. *Neuron* 22, 243-252.
- Rossi, J., Santamaki, P., Airaksinen, M.S., and Herzig, K.H. (2005). Parasympathetic innervation and function of endocrine pancreas requires the glial cell line-derived factor family receptor alpha2 (GFRalpha2). *Diabetes* 54, 1324-1330.

- Sanicola, M., Hession, C., Worley, D., Carmillo, P., Ehrenfels, C., Walus, L., Robinson, S., Jaworski, G., Wei, H., Tizard, R., *et al.* (1997). Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 6238-6243.
- Santoro, M., Carlomagno, F., Melillo, R.M., and Fusco, A. (2004). Dysfunction of the RET receptor in human cancer. *Cell Mol. Life Sci.* *61*, 2954-2964.
- Sarrio, D., Rodriguez-Pinilla, S.M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., and Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* *68*, 989-997.
- Schlechta, B., Wiedemann, D., Kittinger, C., Jandrositz, A., Bonaros, N.E., Huber, J.C., Preisegger, K.H., and Kocher, A.A. (2010). Ex-vivo expanded umbilical cord blood stem cells retain capacity for myocardial regeneration. *Circ. J.* *74*, 188-194.
- Scholer, H.R., Ciesiolka, T., and Gruss, P. (1991). A nexus between Oct-4 and E1A: implications for gene regulation in embryonic stem cells. *Cell* *66*, 291-304.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., and Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* *367*, 380-383.
- Scott, R.P., and Ibanez, C.F. (2001). Determinants of ligand binding specificity in the glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha S. *J. Biol. Chem.* *276*, 1450-1458.
- Seandel, M., Falciatori, I., Shmelkov, S.V., Kim, J., James, D., and Rafii, S. (2008). Niche players: spermatogonial progenitors marked by GPR125. *Cell. Cycle* *7*, 135-140.
- Shimozaki, K., Nakashima, K., Niwa, H., and Taga, T. (2003). Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development* *130*, 2505-2512.
- Somers, A., Jean, J.C., Sommer, C.A., Omari, A., Ford, C.C., Mills, J.A., Ying, L., Sommer, A.G., Jean, J.M., Smith, B.W., *et al.* (2010). Generation of Transgene-Free Lung Disease-Specific Human iPS Cells Using a Single Excisable Lentiviral Stem Cell Cassette. *Stem Cells*
- Song, J., Kiel, M.J., Wang, Z., Wang, J., Taichman, R.S., Morrison, S.J., and Krebsbach, P.H. (2010a). An in vivo model to study and manipulate the hematopoietic stem cell niche. *Blood* *115*, 2592-2600.
- Song, R., Spera, M., Garrett, C., and Yosypiv, I.V. (2010b). Angiotensin II-induced activation of c-Ret signaling is critical in ureteric bud branching morphogenesis. *Mech. Dev.* *127*, 21-27.
- Sornson, M.W., Wu, W., Dasen, J.S., Flynn, S.E., Norman, D.J., O'Connell, S.M., Gukovsky, I., Carriere, C., Ryan, A.K., Miller, A.P., *et al.* (1996). Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* *384*, 327-333.

- Steigman, S.A., and Fauza, D.O. (2007). Isolation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid and placenta. *Curr. Protoc. Stem Cell. Biol. Chapter 1, Unit 1E.2.*
- Suvanto, P., Wartiovaara, K., Lindahl, M., Arumae, U., Moshnyakov, M., Horelli-Kuitunen, N., Airaksinen, M.S., Palotie, A., Sariola, H., and Saarma, M. (1997). Cloning, mRNA distribution and chromosomal localisation of the gene for glial cell line-derived neurotrophic factor receptor beta, a homologue to GDNFR-alpha. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 1267-1273.
- Tahira, T., Ishizaka, Y., Itoh, F., Sugimura, T., and Nagao, M. (1990). Characterization of ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line. *Oncogene* *5*, 97-102.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663-676.
- Takahashi, M., and Cooper, G.M. (1987). Ret Transforming Gene Encodes a Fusion Protein Homologous to Tyrosine Kinases. *Mol. Cell. Biol.* *7*, 1378-1385.
- Takahashi, M., Ritz, J., and Cooper, G.M. (1985). Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* *42*, 581-588.
- Too, H.P. (2003). Real time PCR quantification of GFRalpha-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *114*, 146-153.
- Trupp, M., Belluardo, N., Funakoshi, H., and Ibanez, C.F. (1997). Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J. Neurosci.* *17*, 3554-3567.
- Trupp, M., Raynoschek, C., Belluardo, N., and Ibanez, C.F. (1998). Multiple GPI-anchored receptors control GDNF-dependent and independent activation of the c-Ret receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Neurosci.* *11*, 47-63.
- Tsui-Pierchala, B.A., Ahrens, R.C., Crowder, R.J., Milbrandt, J., and Johnson, E.M., Jr. (2002). The long and short isoforms of Ret function as independent signaling complexes. *J. Biol. Chem.* *277*, 34618-34625.
- Tsuzuki, T., Takahashi, M., Asai, N., Iwashita, T., Matsuyama, M., and Asai, J. (1995). Spatial and temporal expression of the ret proto-oncogene product in embryonic, infant and adult rat tissues. *Oncogene* *10*, 191-198.
- U,H.S., Alilain, W., and Saljooque, F. (2002). Fetal brain progenitor cells transdifferentiate to fates outside the nervous system. *Mol. Endocrinol.* *16*, 2645-2656.

- Uesaka, T., Nagashimada, M., Yonemura, S., and Enomoto, H. (2008). Diminished Ret expression compromises neuronal survival in the colon and causes intestinal aganglionosis in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 1890-1898.
- Urbano, A.G., Suarez-Penaranda, J.M., Dieguez, C., and Alvarez, C.V. (2000). GDNF and RET-gene expression in anterior pituitary-cell types. *Endocrinology* *141*, 1893-1896.
- Vankelecom, H. (2007a). Non-hormonal cell types in the pituitary candidating for stem cell. *Semin. Cell Dev. Biol.* *18*, 559-570.
- Vankelecom, H. (2007b). Stem cells in the postnatal pituitary? *Neuroendocrinology* *85*, 110-130.
- Vankelecom, H., and Gremeaux, L. (2010). Stem cells in the pituitary gland: A burgeoning field. *Gen. Comp. Endocrinol.* *166*, 478-488.
- Wang, L. (2006). Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovasc. Med.* *16*, 89-94.
- Ward, R.D., Raetzman, L.T., Suh, H., Stone, B.M., Nasonkin, I.O., and Camper, S.A. (2005). Role of PROP1 in pituitary gland growth. *Mol. Endocrinol.* *19*, 698-710.
- Wegner, M., and Stolt, C.C. (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.* *28*, 583-588.
- Widenfalk, J., Nosrat, C., Tomac, A., Westphal, H., Hoffer, B., and Olson, L. (1997). Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-beta (GDNFR-beta), novel proteins related to GDNF and GDNFR-alpha with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. *J. Neurosci.* *17*, 8506-8519.
- Widenfalk, J., Parvinen, M., Lindqvist, E., and Olson, L. (2000). Neurturin, RET, GFRalpha-1 and GFRalpha-2, but not GFRalpha-3, mRNA are expressed in mice gonads. *Cell Tissue Res.* *299*, 409-415.
- Wrobel, C.N., Mutch, C.A., Swaminathan, S., Taketo, M.M., and Chenn, A. (2007). Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Dev. Biol.* *309*, 285-297.
- Wu, W., Cogan, J.D., Pfaffle, R.W., Dasen, J.S., Frisch, H., O'Connell, S.M., Flynn, S.E., Brown, M.R., Mullis, P.E., Parks, J.S., Phillips, J.A., 3rd, and Rosenfeld, M.G. (1998). Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat. Genet.* *18*, 147-149.
- Wunderle, V.M., Critcher, R., Hastie, N., Goodfellow, P.N., and Schedl, A. (1998). Deletion of long-range regulatory elements upstream of SOX9 causes campomelic dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 10649-10654.
- Wurmser, A.E., Nakashima, K., Summers, R.G., Toni, N., D'Amour, K.A., Lie, D.C., and Gage, F.H. (2004). Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* *430*, 350-356.
- Xian, C.J., Huang, B.R., and Zhou, X.F. (1999). Distribution of neurturin mRNA and immunoreactivity in the peripheral tissues of adult rats. *Brain Res.* *835*, 247-258.

- Xie, T., and Li, L. (2007). Stem cells and their niche: an inseparable relationship. *Development* *134*, 2001-2006.
- Yoong, L.F., and Too, H.P. (2007). Glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin inhibit neurite outgrowth and activate RhoA through GFR alpha 2b, an alternatively spliced isoform of GFR alpha 2. *J. Neurosci.* *27*, 5603-5614.
- Yoshimoto, K., Tanaka, C., Moritani, M., Shimizu, E., Yamaoka, T., Yamada, S., Sano, T., and Itakura, M. (1999). Infrequent detectable somatic mutations of the RET and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) genes in human pituitary adenomas. *Endocr. J.* *46*, 199-207.
- Yoshimura, F., Harumiya, K., Ishikawa, H., and Otsuka, Y. (1969). Differentiation of isolated chromophobes into acidophils or basophils when transplanted into the hypophysiotrophic area of hypothalamus. *Endocrinol. Jpn.* *16*, 531-540.
- Yoshizato, H., Fujikawa, T., Soya, H., Tanaka, M., and Nakashima, K. (1998). The growth hormone (GH) gene is expressed in the lateral hypothalamus: enhancement by GH-releasing hormone and repression by restraint stress. *Endocrinology* *139*, 2545-2551.
- Zhang, J., Woodhead, G.J., Swaminathan, S.K., Noles, S.R., McQuinn, E.R., Pisarek, A.J., Stocker, A.M., Mutch, C.A., Funatsu, N., and Chenn, A. (2010). Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling. *Dev. Cell.* *18*, 472-479.
- Zheng, H., Ying, H., Wiedemeyer, R., Yan, H., Quayle, S.N., Ivanova, E.V., Paik, J.H., Zhang, H., Xiao, Y., Perry, S.R., *et al.* (2010). PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas. *Cancer. Cell.* *17*, 497-509.
- Zhou, K., Huang, L., Zhou, Z., Hu, C., Liu, W., Zhou, J., and Sun, H. (2010). Wnt and Notch signaling pathways selectively regulating hematopoiesis. *Ann. Hematol.* *89*, 749-757.
- Zhu, X., Gleiberman, A.S., and Rosenfeld, M.G. (2007). Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol. Rev.* *87*, 933-963.

8.- Anexos

8.- ANEXOS

En este anexo se incluyen las publicaciones y patente fruto de todo el trabajo desarrollado durante la realización de la tesis doctoral que se presenta en esta memoria.

8.1.- ANEXO I: PUBLICACIONES

1.- Garcia-Lavandeira, M., Saez, C., Diaz-Rodriguez, E., Perez-Romero, S., Senra, A., Dieguez, C., Japon, M.A., and Alvarez, C.V. (2012). Craniopharyngiomas Express Embryonic Stem Cell Markers (SOX2, OCT4, KLF4, and SOX9) as Pituitary Stem Cells but Do Not Coexpress RET/GFRA3 Receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E80-7.

2.- Garcia-Lavandeira M, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles ME, Rodrigues JS, Perez-Romero S, Bravo SB, Alvarez CV. (2010). Functional role of the RET dependence receptor, GFRA co-receptors and ligands in the pituitary. *Front Horm Res.* 38, 127-38.

3.- Garcia-Lavandeira M, Quereda V, Flores I, Saez C, Diaz-Rodriguez E, Japon MA, Ryan AK, Blasco MA, Dieguez C, Malumbres M, Alvarez CV. (2009). A GRFa2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary. *PLoS One.* 4:e4815

8.2.- ANEXO II: PATENTE

Título: Aislamiento de células hipofisarias multipotentes y diferenciación in vitro de las mismas. Inventores: Álvarez Villamarín Clara, Diéguez González Carlos, García Lavandeira Montserrat, Malumbres Marcos.

N. de solicitud: 200803351

País de prioridad: España

Fecha de prioridad: 25-Nov-2008

Fecha de publicación de la solicitud: 26.05.2010

Entidad titular: Universidad de Santiago de Compostela y Fundación Centro Nacional.

Craniopharyngiomas Express Embryonic Stem Cell Markers (SOX2, OCT4, KLF4, and SOX9) as Pituitary Stem Cells but Do Not Coexpress RET/GFRA3 Receptors

Montserrat Garcia-Lavandeira,* Carmen Saez,* Esther Diaz-Rodriguez, Sihara Perez-Romero, Ana Senra, Carlos Dieguez, Miguel A. Japon, Clara V. Alvarez

Instituto de Investigaciones Sanitarias & Centro de Investigaciones Médicas de la USC (IDIS-CIMUS) (M.G.-L., E.D.-R., S.P.-R., A.S., C.D., C.V.A.), Department of Physiology, School of Medicine, University of Santiago de Compostela (USC), E-15782 Santiago de Compostela, Spain; and Instituto de Biomedicina de Sevilla (C.S., M.A.J.), Hospital Universitario Virgen del Rocío/Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)/Universidad de Sevilla, and Department of Pathology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, E-41013 Seville, Spain

Context: Adult stem cells maintain some markers expressed by embryonic stem cells and express other specific markers depending on the organ where they reside. Recently, stem/progenitor cells in the rodent and human pituitary have been characterized as expressing *GFRA2/RET*, *PROP1*, and stem cell markers such as *SOX2* and *OCT4* (GPS cells).

Objective: Our objective was to detect other specific markers of the pituitary stem cells and to investigate whether craniopharyngiomas (CRF), a tumor potentially derived from Rathke's pouch remnants, express similar markers as normal pituitary stem cells.

Design: We conducted mRNA and Western blot studies in pituitary extracts, and immunohistochemistry and immunofluorescence on sections from normal rat and human pituitaries and 20 CRF (18 adamantinomatous and two papillary).

Results: Normal pituitary GPS stem cells localized in the marginal zone (MZ) express three key embryonic stem cell markers, *SOX2*, *OCT4*, and *KLF4*, in addition to *SOX9* and *PROP1* and β -catenin overexpression. They express the *RET* receptor and its *GFRA2* coreceptor but also express the coreceptor *GFRA3* that could be detected in the MZ of paraffin pituitary sections. CRF maintain the expression of *SOX2*, *OCT4*, *KLF4*, *SOX9*, and β -catenin. However, *RET* and *GFRA3* expression was altered in CRF. In 25% (five of 20), both *RET* and *GFRA3* were detected but not colocalized in the same cells. The other 75% (15 of 20) lose the expression of *RET*, *GFRA3*, or both proteins simultaneously.

Conclusions: Human pituitary adult stem/progenitor cells (GPS) located in the MZ are characterized by expression of embryonic stem cell markers *SOX2*, *OCT4*, and *KLF4* plus the specific pituitary embryonic factor *PROP1* and the *RET* system. Redundancy in *RET* coreceptor expression (*GFRA2* and *GFRA3*) suggest an important systematic function in their physiological behavior. CRF share the stem cell markers suggesting a common origin with GPS. However, the lack of expression of the *RET/GFRA* system could be related to the cell mislocation and deregulated growth of CRF. (*J Clin Endocrinol Metab* 97: E80–E87, 2012)

There are four essential genes expressed in embryonic stem cells: *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, and *NANOG* (1). Two, *SOX2* and *OCT4*, of the four were detected previously through immunostaining in the marginal zone (MZ) of the rat and human pituitary, where the stem/progenitor cells of the pituitary (GPS) reside in a niche (GPS niche). However, rat GPS are adult stem cells, and we know they also coexpress *SOX9*, *PROP1*, and *SSEA4* and overexpress β -catenin (2–4). Because it is still unproven that GPS fulfill all the characteristics of true stemness in this work, we use the term stem in a broad sense to refer to the GPS, including the stem cells, or its transit-amplifying derivatives. Some stem cell antibodies do not work in pituitary paraffin sections, and it was unclear whether human GPS retained expression of the same embryonic transcription factors and stem markers as rat GPS.

Rat GPS instead of stem cell markers for pluripotentiality also coexpress proteins of the RET/glial cell line-derived neurotrophic factor receptor- α (GFR α) family. The RET tyrosine kinase receptor has four coreceptors in mammals (GFR α 1–4) that help specify which of the four different ligands (GDNF, NTN, ART, and PSP) will activate the receptor in a given cell. We know that the combination RET/GFR α 1 is expressed by the somatotrophs (GH-secreting cells) within the human and rat adenopituitary (AP) (5–7). Rat GPS stem cells also express the RET receptor but with a different coreceptor, the GFR α 2 coreceptor (2). Still unknown was whether there was expression of any of the two other coreceptors in the pituitary and whether the expression was conserved in human pituitary.

Craniopharyngiomas (CRF) are benign neoplasms with unclear pathogenesis. The two proposed origins are either from Rathke's pouch embryonic remnants or altered metaplastic adenohypophyseal cells in the pituitary stalk or gland (8). However, a third potential origin must be added after the discovery of postnatal pituitary stem cells. We investigated whether CRF might share expression of GPS markers.

Materials and Methods

mRNA and protein expression in pituitary lysates

Animal experiments were approved by the Ethical Committee of the University of Santiago de Compostela and by the Animal Welfare Committee of the Xunta de Galicia. Human pituitary samples and CRF were selected from the archives of the Department of Pathology, Hospital Universitario Virgen del Rocío (Seville, Spain), following procedures according to Hospital Ethical Committee recommendations.

Rat pituitaries were obtained from adult (200 g, 60 d old) male Wistar rats and immediately frozen after dissection. Neuropituitary was discarded (rAP). In some samples, the area

around the MZ was manually dissected (rMZ) and the majority of the AP discarded (see Supplemental Methods, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>). Thick sections (50 μ m) of frozen human pituitaries were extended in a slide and the area surrounding the MZ manually dissected.

mRNA was isolated with Trizol (Roche, Barcelona, Spain) as described (5, 9). Primers and conditions are listed in Supplemental Methods.

Frozen pituitaries or dissected tissues were mixed with 100 (MZ) or 200 (rAP) μ l hot 1% sodium dodecyl sulfate at 95 C, homogenized in a polytron (Dremel, Breda, the Netherlands) for 10 sec, and further incubated for 5 min at 95 C in a thermoblocker. Then 1.5 vol of Triton buffer [50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mg/ml aprotinin, 2% Na₃VO₄, 0.1 M sodium pyrophosphate] was added, and the sample was homogenized through a 25-gauge syringe followed by incubation in ice for 20 min. Eppendorf tubes were centrifuged at 14,000 rpm for 5 min at 4 C. The supernatant was kept at –80 C, and 75–100 μ g protein was loaded per lane.

Tissue extracts were obtained with hot sodium dodecyl sulfate and then diluted with Triton lysis buffer as described (5, 9). Detailed procedures and antibodies are detailed in Supplemental Methods.

Immunohistochemistry studies

Rat pituitary cryosections (10 μ m) were obtained from frozen pituitaries. Alternatively, rats were deeply anesthetized, perfused with saline, and finally fixed with neutral buffered formalin. Pituitaries were dehydrated in 70% ethanol and included in paraffin.

Paraffin-embedded, 2-mm-diameter tissue cores were arrayed in a paraffin block with all CRF resected from 2002–2009, including regrowth tumors corresponding to different patients from those with primary tumors. Medical autopsy pituitaries from control subjects were selected with the criteria of optimal preservation of histology and orientation of the MZ. Control tissues in the array were adult tonsils and embryo neural tissue because they provide recognizable target cells expressing stem cell markers. Patient and tumor characteristics are described in Table 1. Standard formalin-fixation paraffin-embedding procedures were followed. Immunoperoxidase was performed using Envision-HRP system (Dako, Barcelona, Spain). In most cases, slides were counterstained with hematoxylin. See detailed list of antigen recovery, antibodies, and dilutions in Supplemental Methods.

Results

Embryonic stem cell markers and the RET/GFR α system are expressed in the MZ of the normal pituitary

To further characterize the markers expressed by the GPS in rat and human pituitary, we investigated the mRNA and protein expression of embryonic stem cell markers and the RET/GFR α system. We checked mRNA expression in rat whole AP (rAP), including GPS niche,

intermediate lobe, and secretory portion but without neuropituitary (NP). We used the testis for comparative purposes because they have a well-studied niche of stem cells that express RET and GFRA receptors among other stem factors such as Oct4 or Sox9 (10–12). In both organs, we

detected expression of *Sox2*, *Klf4*, *Oct4*, *Sox9*, *Gfra2*, *Gfra3*, and *Ret* (Fig. 1A, left). Although some markers were commonly expressed, there were differences between both organs because AP, but not testes, expressed abundantly *Sox2* and *Gfra3*, and as expected, *Prop1* was ex-

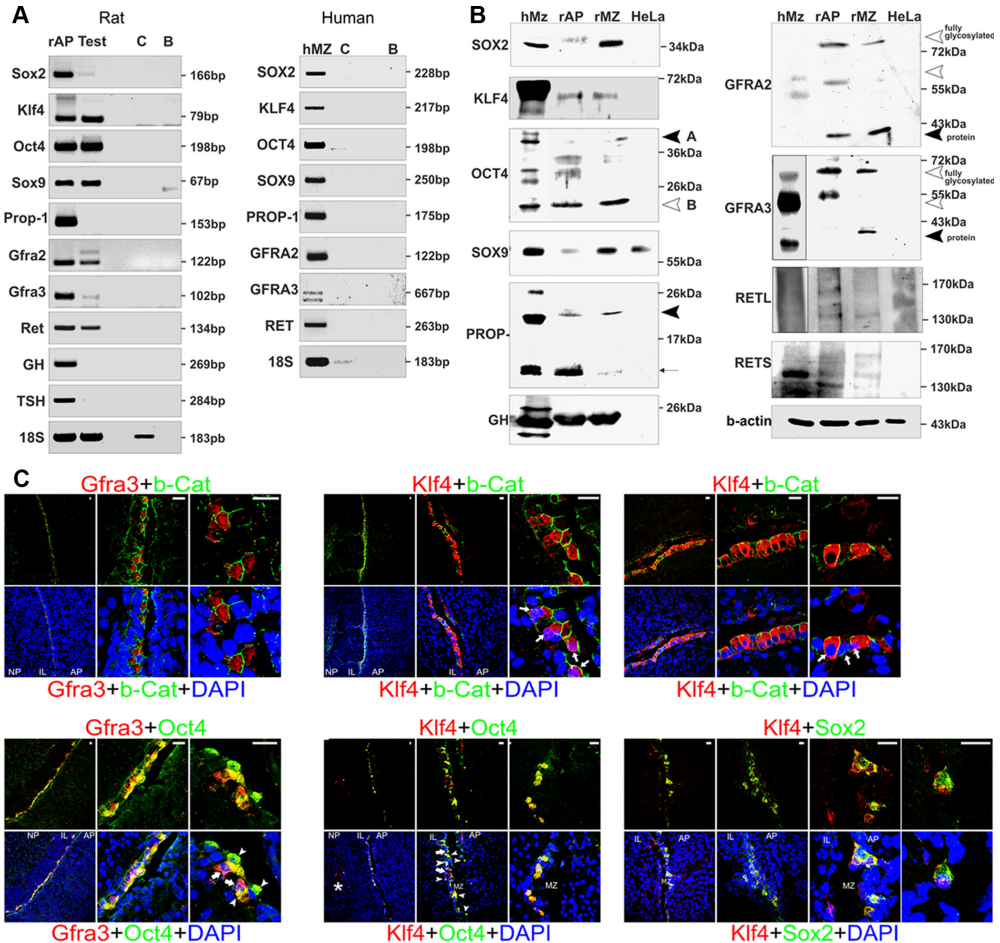


FIG. 1. Expression markers characteristic of normal GPS stem cells in the rat and human pituitary. Panel A, mRNA expression in rAP in comparison with the testes (Test), used as control tissue for some of the markers, and hMZ. Non-reverse-transcribed RNA (C) and a non-cDNA PCR (B) were used as controls. Panel B, Western blots showing the bands recognized by the antibodies in hMZ and rat extracts. HeLa extracts were used as positive human controls for some of the proteins. Enrichment in the selected rMZ in comparison with total rAP should be expected when the protein is exclusively expressed in the GPS niche. OCT4 presented two isoforms, the higher band (isoform A) being essential in embryonic stem cell lines. PROP1 presented one band of the correct size plus a smaller band that seems to be a degradation product. GFRA2 and GFRA3 coreceptors present three bands corresponding with the nonglycosylated to the fully glycosylated proteins. Both isoforms of the RET receptor were detected (long, RET-L, and short, RET-S) but they were not enriched in the rMZ because they are also expressed in somatotrophs. Panel C, Double immunofluorescence in rat pituitary sections in confocal microscopy. Gfra3 and Klf4 (red) are colocalized with a cytoplasmic (β -catenin (b-Cat), green) or a nuclear (Oct4 and Sox2, green) marker. Nuclei are stained with DAPI (blue). Gfra3 is a membrane marker, whereas Klf4 is nuclear because it is merged with DAPI (magenta, blended nuclei, arrows). For Klf4 and β -catenin cryosections and ultrafine paraffin sections (right) are shown. With nuclear markers, most cells presented merged colored nuclei (orange, arrowheads). Scale bars, 10 μ m. Panel D, Hematoxylin and eosin (H&E) and immunohistochemistry in normal human pituitary. Scale bars, 25 μ m.

D

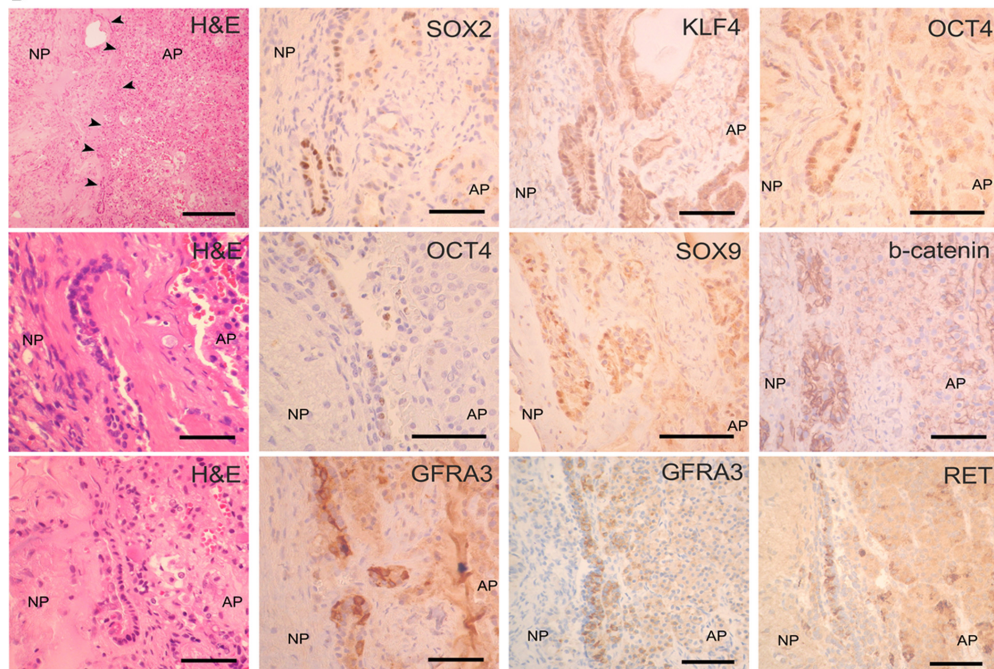


FIG. 1. Continued.

clusively detected in AP as the mRNA for GH used as positive control. *GFRa4* mRNA was undetectable as described (data not shown) (13).

We isolated mRNA from the GPS niche of the MZ of normal human pituitary frozen sections. We made an initial hematoxylin and eosin staining used as a pattern to manually dissect the MZ, discarding the surrounding tissue belonging to the NP and the secretory portion of the AP (Supplemental Methods). We considered this mRNA as highly enriched in the GPS stem cell niche of the MZ [human MZ (hMZ)]. We performed mRNA detection of the above markers with specific primers for human genes. All the markers of stemness (*SOX2*, *KLF4*, *OCT4*, and *SOX9*) plus *PROP1* and the receptors *RET*, *GFRa2*, and *GFRa3* were detected (Fig. 1A, right).

Next, our interest was focused on the expression of the proteins in the pituitary, quite challenging in some instances. There are polyclonal antibodies that recognize nonspecifically other related proteins of the same family, and there are monoclonal antibodies that work poorly when proteins are denatured such as in Western blot or in formalin-fixed paraffin-embedded immunohistochemistry. We compared human extracts enriched in the MZ

(hMZ), rat whole AP plus intermediate lobe (IL) (rAP), and rat MZ (rMZ) where most AP and IL tissue and the whole NP was manually discarded, maintaining a small portion similar to the shape of the letter C from the border AP/IL where the MZ is localized (Supplemental Methods). Although due to the manual dissection, this portion included some AP, we considered that markers characteristic of the GPS stem niche should be quantitatively enriched in MZ when compared with rAP. We added HeLa extract as a human control for some of the stem cell markers.

All markers were easily detected in hMZ at the correct weight. In the rat extracts, the markers were enriched in rMZ in comparison with rAP except the RET receptor that is also expressed in somatotrophs together with GH (Fig. 1B). OCT4 presented two isoforms (A, 40 kDa and B, 25 kDa) although both are expressed in the zygote only the A isoform maintains embryonic stem cell pluripotentiality (14, 15). The OCT4A isoform was abundant in hMZ and rMZ. In *PROP1*, in addition to the 21-kDa full-length band abundant in hMZ and rMZ, a second band of 12 kDa appeared that seemed to be a degradation product. *GFRa2* was more easily detected in rMZ, whereas *GFRa3* was more intense in hMZ. Both are GPI-anchor receptors,

and thus, three bands appear from the nude protein to the mature heavily glycosylated membrane protein. The two isoforms of RET receptor (RET-S and RET-L) were detected, but they were not enriched in rMZ because they are not only expressed in the MZ but also expressed in somatotrophs within the AP. Except for SOX9, HeLa cells express low quantities of the stem cell or RET family markers because we needed long exposures to obtain positivity (data not shown).

KLF4 and GFRA3 are expressed in the GPS niche of the MZ in human pituitaries

We studied the localization of the two previously undescribed markers KLF4 and GFRA3 in rat pituitary (Fig. 1, C and D). We performed double staining with β -catenin, a protein bound to the cytoplasmic side of the plasma membrane and overexpressed in the GPS niche, and with Oct4 and Sox2, two transcription factors, both exclusive markers expressed in GPS stem cells (2). We detected intense Klf4 staining (red) only in the MZ where the GPS niche resides. The protein localized in the nuclei and cytoplasm as detected by costaining with β -catenin (green) with a peripheral submembrane location, by colocalization with DAPI (purple merged color delimiting the nuclei) and by colocalization with Oct4 or Sox2 (yellow), both nuclear proteins. GFRA3 positivity was specifically detected in the MZ. It was a membrane staining because it was framed by β -catenin (green) but did not colocalize with DAPI, delimiting an extracellular surface of a polygonal cell. A similar staining has been described for GFRA2 (2, 9). When costained with Oct4 and DAPI, nuclear Oct4 was merged with Klf4 but not with GFRA3 expressed in the membrane and sorting pathway.

In the human pituitary MZ, GPS cells surrounding the Rathke's cells' cysts expressing stem cell markers has been already demonstrated (2). We studied the expression of the already known markers (SOX2, OCT4, and SOX9) and the other stem cell markers detected in the protein extracts (KLF4, RET, GFRA3, and β -catenin) in four normal human pituitaries in parallel using immunohistochemistry. Intensity of expression was quantified (Fig. 1D and Table 1) in comparison with positive control embryonic tissues (Supplemental Table 2 and Figure 3). We were unable to detect in paraffin-embedded sections two of the markers: GFRA2 (previously detected in cryosections) (2, 9) and PROP1 whose guinea pig antibody did not work properly under commercial formalin fixation (A. Ryan, personal communication, and our own data).

The three embryonic stem cell markers SOX2, KLF4, and OCT4 appeared intensely stained in the GPS niche of the MZ where also resided the positive cells for SOX9. Only SOX2 also presented less intense (1 vs. 0.1) cyto-

plasmic positivity in few cells of the AP. As described for rat AP (2), GPS cells overexpressed β -catenin when compared with the epithelial cells in the AP. The RET receptor presented positivity in the GPS niche but was stronger in the AP because the somatotrophs also express this receptor (5–7). As in the rat pituitary, GFRA3-positive cells were concentrated in the GPS niche in the same cells that express RET but the AP was negative (Fig. 1C).

CRF express typical pituitary stem cell markers but showed an alteration of the coexpression of the RET receptor and its coreceptor GFRA3

We studied the expression of the GPS stem cell markers in a series of 20 CRF. CRF are histologically benign neoplasms characterized by complex pattern of epithelia, fibrous stroma, necrotic cyst contents, calcification, and cholesterol crystals. CRF are classified into two primary subtypes: adamantinomatous CRF (AC), the most common, and papillary CRF (PC) (8). The epithelial component of the AC is composed of a distinct layer of palisaded basal cells, an intermediate layer of stellate cells, and a top layer of keratinized squamous cells. The papillary subtype (PC) is composed of mature squamous epithelium forming pseudopapillae, without palisaded or stellate cells. The most common location of CRF is suprasellar with an intrasellar component (16). Because GPS are cells with stem cell properties in the postnatal pituitary, we consider that CRF cells have many possibilities to be derived from wayward GPS cells that due to any alteration have been lost in the migratory way of Rathke's pouch cells. In our series, only two cases were PC, whereas 18 cases were AC, coinciding with the higher frequency of this subtype.

All CRF maintain stem cell nuclear expression of SOX2, OCT4, KLF4, and SOX9 (Fig. 2A and Table 1). SOX2 and OCT4 expression in AC was focally detected in the nuclei of basal palisade, diminishing in intensity toward stellate or squamous cells. KLF4 and SOX9 had less reinforce in the palisade cells and a more diffuse pattern of expression in the three epithelial layers of AC. Although in PC, palisade basal cells are not present, SOX2, OCT4, KLF4, and SOX9 were mainly expressed in the nuclei of basal epithelial cells, diminishing in intensity toward squamous cells. This organization with more intense cells in the palisade cells surrounding the cysts or the basal layer reminds us of the physiological GPS niche in the normal pituitary. Submembrane β -catenin immunostaining was observed in both AC and PC, similar to the GPS stem cells in the normal pituitary (compare Figs. 1D and 2A). All but three AC showed focal nuclear localization of β -catenin in accordance with the high frequency (70%) of β -catenin exon 3 mutations in this CRF subtype (Fig. 2A). No nu-

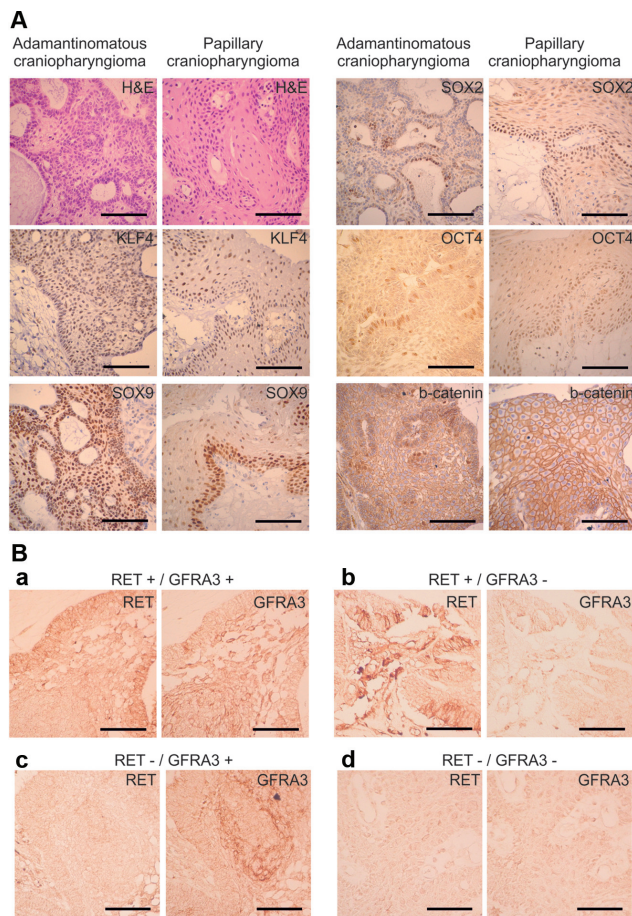


FIG. 2. Expression of the pituitary stem cell markers in CRF. **A**, Hematoxylin and eosin (H&E) and immunohistochemistry in AC and PC. **B**, A representative case of each group of CRF is shown; **a**, a case maintaining RET⁺ (palisade) and GFRA3⁺ (stellate) expression but not coincident in the same cells; **b–d**, cases where either RET or GFRA3 expression or both is lost.

clear β -catenin was present in PC because they do not have mutated β -catenin (8, 16).

We also studied RET and GFRA3 expression. Five AC were positive for RET and GFRA3 (Fig. 2Ba and Table 1). However, although RET expression was intense in the palisade cells surrounding the cysts like the other stem cell markers, GFRA3 was positive in the stellate cells. The mirror image indicated that they were not coexpressed in the same cells. Thus, either RET or GFRA3 expression is lost in every individual cell. We could not find any relationship between RET/GFRA3 loss and nuclear β -catenin positivity, because of the five AC with mislocalized RET/

GFRA3 expression, there were three with nuclear β -catenin and two with cytoplasmic β -catenin.

The unexpected result was that 75% of the CRF (15 of 20) failed to express one or both proteins of the GFRA3/RET system (Fig. 2B, b–d, and Table 1). Of these 15 CRF, five (one third) lose only GFRA3, maintaining RET; five (one third) lose only RET, maintaining GFRA3; and five (one third) lose completely GFRA3 and RET expression, including both PC.

In summary, alteration of the coexpression of the RET receptor and its co-receptor GFRA3 is a common finding in CRF.

Discussion

GPS cell residence and organization in the MZ of the pituitary is maintained in the three species studied (rat, mouse, and human). Similarly, expression of similar markers is also conserved, suggesting an essential role of such markers in the physiological behavior of these cells. The markers expressed by GPS stem cells can be classified into four categories: 1) pluripotential embryonic stem cell markers such as SOX2, OCT4, and SOX9 (2–4), to which we add KLF4; 2) the embryonic pituitary specific transcription factor PROP1, a marker presently impossible to detect by immunohistochemistry but easily detected by RT-PCR and Western blot; 3) cytoskeleton-related markers such as cytokeratins, E-cadherin, and β -catenin that are overexpressed in pituitary stem cells (2, 9); and 4) RET receptor and its co-receptors GFRA2 and GFRA3. The function of the RET/GFRA system in GPS cells is unknown. In the embryonic development of the kidneys and parasympathetic autonomic nervous system, RET/GFRA is implicated in guidance of the cells to the correct target. However, in the central nervous system, RET/GFRA is implicated in survival. RET and GFRA1 are coexpressed in somatotrophs where they regulate survival and differentiation through a Pit-1/Arf/p53 pathway (5–7) (Diaz-Rodriguez, E., M. Garcia-Lavandeira, S. Perez-Romero, A. Senra, C. Cani-

TABLE 1. Semiquantitative analysis of the immunohistochemical analysis in normal human pituitary and CRF

Sample no.	Age (yr)	Gender	Sample	Histology	Area or subtype	SOX2	KLF4	OCT4	SOX9	β-Catenin			RET
										Membrane	Nuclear	GFRA3	
Normal human pituitary													
1	66	M	H1-MZ	Normal pituitary	MZ, GPS niche	2	2	1	2	3	0	1	0.5
			H1-AP		AP	0	0	0	0	2	0	0	2
2	83	F	H2-MZ	Normal pituitary	MZ, GPS niche	1	1	1	2	3	0	1	1.5
			H2-AP		AP	0	0	0	0	2	0	0	2
3	2 months	F	H3-MZ	Normal pituitary	MZ, GPS niche	n.p.	1	1	n.p.	n.p.	n.p.	1	2
			H3-AP		AP	0	0	0	0	2	0	0	1
4	3	M	H4-MZ	Normal pituitary	MZ, GPS niche	n.p.	1	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	2	0.5
			H4-AP		AP	0	0	0	0	2	0	0	2
CRF													
1	12	M	A1	CRF	AC, recurring	1	1	1	3	2	1	0	2
2	17	F	A2	CRF	AC	2	2	2	3	3	1	0	1
3	61	F	A3	CRF	AC	2	2	1	3	3	1	1	1
4	33	F	A4	CRF	AC	t.d.	t.d.	2	2	2	1	0	0
5	47	M	A5	CRF	AC	1	2	1	2	2	1	1	0
6	40	F	B1	CRF	AC	1	2	2	3	2	1	2	2
7	8	M	B2	CRF	AC, recurring	1	2	1	3	3	0	2	1
8	26	M	B3	CRF	AC	1	2	1	3	3	2	1	0
9	11	F	B4	CRF	AC	0	1	1	3	2	2	1	0
10	33	M	B5	CRF	AC	0	1	1	3	2	2	1	0
11	63	M	C1	CRF	AC	1	2	2	3	2	1	1	1
12	31	M	C2	CRF	AC	1	2	2	3	3	1	0	2
13	63	M	C3	CRF	AC	2	2	1	3	3	2	0	2
14	15	F	C4	CRF	AC	0	1	1	3	3	1	2	1
15	10	M	C5	CRF	AC, recurring	t.d.	t.d.	1	3	3	0	1	1
16	3	M	D1	CRF	AC	1	1	1	2	t.d.	0	0	0
17	43	F	D2	CRF	PC	2	2	1	2	3	0	0	0
18	48	F	D3	CRF	AC	2	1	2	2	2	0	0	1
19	43	F	D4	CRF	PC	1	2	1	2	3	0	0	0
20	46	F	D5	CRF	AC	t.d.	t.d.	t.d.	t.d.	t.d.	t.d.	0	0

F, Female; M, male; n.p., not performed; t.d., technically discarded.

bano, I. Palmero, M. Borrello, C. Dieguez, unpublished observations). The RET-knockout mouse has a bigger pituitary with enhanced number of somatotrophs but dies postnatally. This precludes detailed studies in the adult GPS niche.

CRF are benign tumors located in the Rathke's pouch migratory path and its surroundings. We have demonstrated that CRF express embryonic stem markers similar to normal GPS cells. The only previous publication demonstrated SOX9 expression in four AC (17). However, in this work, SOX2 expression was negative. We think that this is a technical problem due to intrinsic difficulty of stem cell markers staining in paraffin samples.

CRF also express β-catenin. We have not checked our series, but many AC present nuclear located β-catenin due to activating mutations in codon 41 of exon 3 (18, 19). It's suggested that Wnt ligands promote migration of CRF cells (20). A recent animal model for AC was generated expressing this mutated β-catenin under the *Hesx1* promoter (17). These mice with an activated *Wnt/β-catenin* pathway in the embryonic pituitary progenitors present AC already as young adults. The tumors express mutated β-catenin and some markers of GPS cells. This model

strongly suggests that also human CRF derive from GPS stem/progenitors. However, PC do not present β-catenin mutations in any series studied. Our data show the alteration or loss of RET/GFRA3 coexpression in both types of CRF, suggesting an important role of the RET system in the correct localization of the pituitary GPS stem cells at the MZ where they would proliferate under a controlled environment. This role fits with the known role of RET/GFR in kidney development, actively implicated in guiding epithelial cell directional movement for ureter budding and branching, or parasympathetic neurons development (21, 22).

Our data are descriptive, and more extensive morphological studies, out of the scope of this brief report, will provide more insight on the biology of GPS cells. Although we have studied a limited series of cases and normal pituitaries, altered colocalization of RET and its coreceptor or repression of either RET or GFRA expression could be implicated in CRF pathogenesis. The precise characterization of CRF markers could open in the future a new avenue of studies on early diagnosis of recurrences or on chemotherapy with RET tyrosine kinase inhibitors.

Acknowledgments

The text has been reviewed by G. Lockhart, a professional editor of biomedical English.

Address all correspondence and requests for reprints to: Clara V. Alvarez, Instituto de Investigaciones Sanitarias & Centro de Investigaciones Médicas de la USC (IDIS-CIMUS), Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela (USC), E-15782 Santiago de Compostela, Spain. E-mail: clara.alvarez@usc.es.

This project has been supported by Xunta de Galicia-Ministerio de Ciencia e Innovación-FEDER Grants 06PXIB208107PR, 09CSA011208PR, BFU2007–60571, and BFU2010–16652 to C.V.A. E.D.-R. has been an Anxeles Alvario fellow (Xunta de Galicia). This program is cofinanced by the European Community (Fondo Social Europeo, FEDER). M.A.J. is supported by Consejería de Salud, Junta de Andalucía (AI-0003-2010). C.S. is a fellow of Programa de estabilización I3-SNS, ISCHII/Consejería de Salud, Junta de Andalucía.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Pera MF 2010 Defining pluripotency. *Nat Methods* 7:885–887
- Garcia-Lavandeira M, Quereda V, Flores I, Saez C, Diaz-Rodriguez E, Japon MA, Ryan AK, Blasco MA, Dieguez C, Malumbres M, Alvarez CV 2009 A GRFa2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary. *PLoS ONE* 4:e4815
- Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson IC 2008 SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2907–2912
- Chen J, Gremeaux L, Fu Q, Liekens D, Van Laere S, Vankelecom H 2009 Pituitary progenitor cells tracked down by side population dissection. *Stem Cells* 27:1182–1195
- Cañibano C, Rodriguez NL, Saez C, Tovar S, Garcia-Lavandeira M, Borrello MG, Vidal A, Costantini F, Japon M, Dieguez C, Alvarez CV 2007 The dependence receptor ret induces apoptosis in somatotrophs through a pit-1/p53 pathway, preventing tumor growth. *EMBO J* 26:2015–2028
- Japón MA, Urbano AG, Sáez C, Segura DI, Cerro AL, Diéguez C, Alvarez CV 2002 Glial-derived neurotrophic factor and RET gene expression in normal human anterior pituitary cell types and in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1879–1884
- Urbano AG, Suárez-Peñaranda JM, Diéguez C, Alvarez CV 2000 GDNF and RET-gene expression in anterior pituitary-cell types. *Endocrinology* 141:1893–1896
- Karavitiaki N, Cudlip S, Adams CB, Wass JA 2006 Craniopharyngiomas. *Endocr Rev* 27:371–397
- Garcia-Lavandeira M, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles ME, Rodrigues JS, Perez-Romero S, Bravo SB, Alvarez CV 2010 Functional role of the RET dependence receptor, GFRa co-receptors and ligands in the pituitary. *Front Horm Res* 38:127–138
- Chaboisier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lützkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR, Schedl A 2004 Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131:1891–1901
- Ohbo K, Yoshida S, Ohmura M, Ohneda O, Ogawa T, Tsuchiya H, Kuwana T, Kehler J, Abe K, Schöler HR, Suda T 2003 Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice small star, filled. *Dev Biol* 258:209–225
- Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M, Sariola H 2000 Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 287:1489–1493
- Lindahl M, Poteryaev D, Yu L, Arumae U, Timmusk T, Bongarzone I, Aiello A, Pierotti MA, Airaksinen MS, Saarma M 2001 Human glial cell line-derived neurotrophic factor receptor $\alpha 4$ is the receptor for persephin and is predominantly expressed in normal and malignant thyroid medullary cells. *J Biol Chem* 276:9344–9351
- Cauffman G, Liebaers I, Van Steirteghem A, Van de Velde H 2006 POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Stem Cells* 24:2685–2691
- Lee J, Kim HK, Rho JY, Han YM, Kim J 2006 The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem* 281:33554–33565
- Müller HL 2010 Childhood craniopharyngioma: current concepts in diagnosis, therapy and follow-up. *Nat Rev Endocrinol* 6:609–618
- Gaston-Massuet C, Andoniadou CL, Signore M, Jayakody SA, Charolidi N, Kyeyune R, Vernay B, Jacques TS, Taketo MM, Le Tissier P, Dattani MT, Martinez-Barbera JP 2011 Increased wingless (Wnt) signaling in pituitary progenitor/stem cells gives rise to pituitary tumors in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:11482–11487
- Sekine S, Shibata T, Kokubu A, Morishita Y, Noguchi M, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S 2002 Craniopharyngiomas of adamantinomatous type harbor β -catenin gene mutations. *Am J Pathol* 161:1997–2001
- Hölsken A, Kreutzer J, Hofmann BM, Hans V, Oppel F, Buchfelder M, Fahlbusch R, Blümcke I, Buslei R 2009 Target gene activation of the wnt signaling pathway in nuclear β -catenin accumulating cells of adamantinomatous craniopharyngiomas. *Brain Pathol* 19:357–364
- Hölsken A, Buchfelder M, Fahlbusch R, Blümcke I, Buslei R 2010 Tumour cell migration in adamantinomatous craniopharyngiomas is promoted by activated wnt-signalling. *Acta Neuropathol* 119:631–639
- Costantini F 2010 GDNF/Ret signaling and renal branching morphogenesis: from mesenchymal signals to epithelial cell behaviors. *Organogenesis* 6:252–262
- Runeberg-Roos P, Saarma M 2007 Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases. *Ann Med* 39:572–580

Cartoon showing the pituitary dissections.

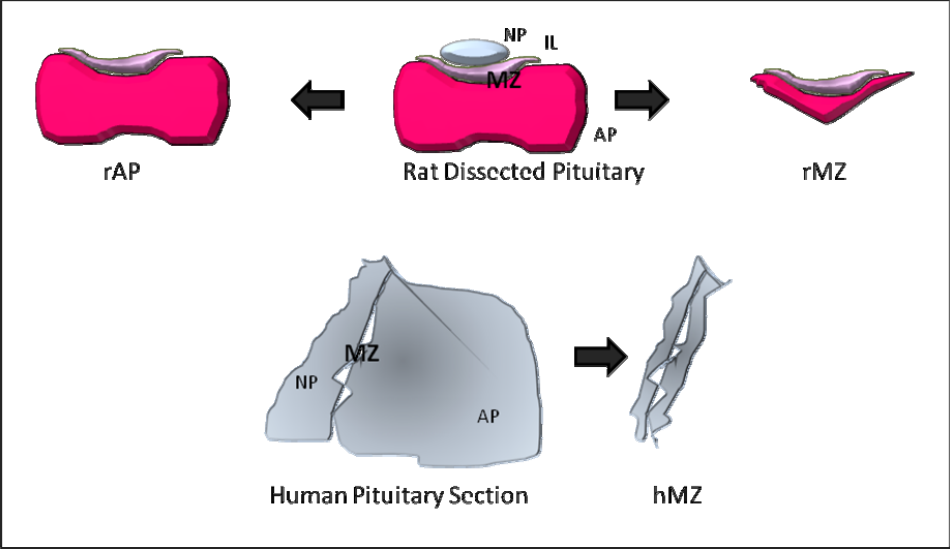


Figure 1

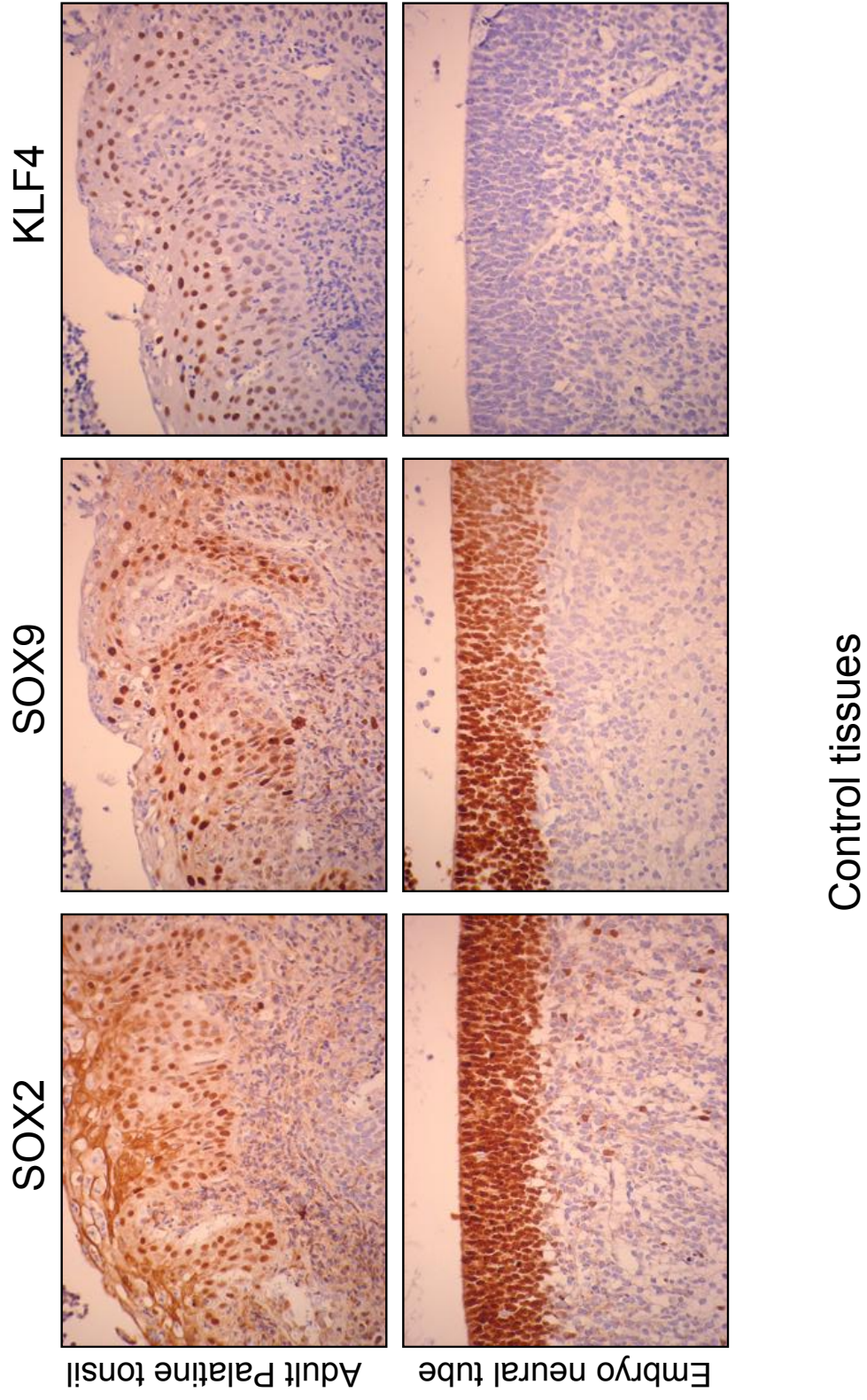


Table 1. Semiquantitative analysis of the immunohistochemical analysis in normal human tissues considered as controls.

N°	SAMPLE	HISTOLOGY	SOX2	KLF4	OCT4	SOX9	b-catenin		GFRα3	RET
							membrane	nuclear		
1	E1	Embryo neural tube	2	0	1	3	2	0	0	2
2	E2	Adult Palatine tonsil	1	1	0	2	2	0	0	0
3	E3	Adult Palatine tonsil	2	2	0	3	2	0	0	0

Table M1. Primers and conditions used in RT-PCR

Gene	Sequence	Amplification size	Annealing T ^a
<i>rat Sox2</i>	F-5'- GCTGCCTCTTTAAGACTAGGGC -3'	166bp	60°C
	R-5'- GAGACGGGCGAAGTGCAATT -3'		
<i>rat Klf4</i>	F-5'-ACCAGGCACTACCGCAAACACA-3'	79bp	60°C
	R-5'-GGTCCGACCTGGAAAAGGCC -3'		
<i>rat Oct4</i>	F-5'- AGACAACCATCTGCCGCTTCGA -3'	198bp	60°C
	R-5'-CAATGCTAGTGATCTGCTGC -3'		
<i>rat Sox9</i>	F-5'- AGAGCGTTGCTCGAACTGT-3'	67bp	60°C
	R-5'- TCCTGGACCGAACTGGTAAA-3'		
<i>rat Prop-1</i>	F-5'GACAGCTGGAGTCAGCCTTT -3'	153bp	60°C
	R-5'-GGAGTAGTGACCGCTCTTGC-3'		
<i>rat Gfra2</i>	F-5'TTCAGGCTCGCTTCAATCTT-3'	122bp	60°C
	R-5'-GAGCGAAGCTTCTTGCAATT-3'		
<i>rat Gfra3</i>	F-5'TGATCCTGCTACTGGTGCTG-3'	102bp	60°C
	R-5'-TTTTTCTGGCCTGGGTACAG-3'		
<i>rat Ret</i>	F-5'- CATCAAGTTGTACGGGGCTT-3'	134bp	60°C
	R-5'- TGCTCCAAGTCTCACATAG -3'		
<i>rat GH</i>	F-5'- GCAGAGAACTGACATGGAATTG-3'	269bp	60°C
	R-5'- TTTTGAGCAGAGCGTCATC-3'		
<i>rat TSH</i>	F-5'-CTCTTTCCGTGCTTTTCGCTCTTGCTT-3'	284bp	60°C
	R-5'- GCAACGGGGTAGGAGAAATAAGGAG-3'		
<i>Human & rat 18s</i>	F-5'-CCATCCAATCGCTAGTAGCG-3'	183bp	60°C
	R-5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'		
<i>Human SOX2</i>	F-5'-GTTGTCAAGGCAGAGAAGAG-3'	228bp	60°C
	R-5'-GAGAGAGGCAAACCTGGAATC-3'		
<i>Human KLF4</i>	F-5'-CAGAGGAGCCCAAGCCAAAGAG-3'	217bp	60°C
	R-5'-CGGTAGTGCCTGGTCAGTTCAGC-3'		
<i>Human OCT4</i>	F-5'-CCGTGAAGCTGGAGAAGGAGAAG-3'	198bp	60°C
	R-5'-AGCGGCAGATGGTCGTTTGG-3'		
<i>Human SOX9</i>	F-5'-GGTCAGCCAGGTGCTCAAAG-3'	250bp	60°C
	R-5'-CTCCGCCTCCTCCACGAAG-3'		
<i>Human PROP-1</i>	F-5'- AACCAGTACCCGACATCTG -3'	175bp	60°C
	R-5'- CTGGCAAGAAGCTGGAAAAG -3'		
<i>.Human GFRA2</i>	F-5'-TTCAGGCTTCTTCAATCTT-3'	122bp	60°C
	R-5'-GAGCGCAGCTTCTTGCAATT-3'		
<i>Human GFRA3</i>	F-5'-CACAGTGACCAGCAAACC-3'	667bp	60°C
	R-5'-CCAGTCCTGGGAGAAGAG-3'		
<i>Human RET</i>	F-5'- GGATTAAGCTGGCTATGGCA -3'	263bp	60°C
	R-5'-GGAGTAGCTGACCGGGAA-3'		

Table M2. Antibodies used in the experiments and its dilutions. The origin of the antibody is labelled as Mouse (M), Rabbit (R), Guinea Pig (GP) and Goat (G). Antigens in the immunohistochemistry were recovered following manufacturer's instructions (DAKO) with microwave cycles in TE Buffer (pH:9) and linker for 10 minutes (DAKO).

1 st Antibody	Company	Origin	Dilution		
			WB	IF	IH
SOX2	Seven Hills, WRAB-SOX2	R	1:500		1:500
SOX2	Abcam, ab79351	M		1:100	
KLF4	Santa Cruz B, sc-20691	R	1:500	1:100	1:300
OCT4	Millipore, MAB4305	M	1:500	1:100	
OCT4	Cell Marque	M			1:50
SOX9	Santa Cruz B, sc-20095	R	1:500		1:50
b-catenin	Millipore, 05-665	M		1:300	
b-catenin	Neomarkers	R			1:150
PROP-1	In house (Lavandeira et al. 2009)	GP	1:500		
GFRa2	QED Bioscience, 1135	R	1:600		
GFRa3	Millipore, AB5142	R	1:500	1:100	1:100
RET-L	Santa Cruz B, sc-1290	G	1:800		
RET-S	Santa Cruz B, sc-167	R	1:500		
cRET	IBL	R			1:50
GH	NIDDK, AFP-C11981A	R	1:800		
b-actin	Sigma, A5316	M	1:1000		
2nd Antibody	Company		Dilution		
			WB	IF	IH
Anti-mouse IgG/HRP	DAKO, P0260	R	1:5000		
Anti-goat IgG-HRP	Sta.Cruz Biotech, sc-2020	D	1:5000		
Anti-rabbit IgG-HRP	GE Healthcare NA934V	D	1:5000		
Anti-guinea pig IgG-HRP	Jackson, 106-035-006	G	1:5000		
Anti-mouse+rabbit-HRP ENVISION	DAKO	Manufacturer's instructions			
Anti-rabbit-Fab-Cy2 (Rabbit Anti-Mouse IgG, F(ab') ₂)	Jackson, 315-226-047	R		1:1000	
Anti-rabbit-Fab-Cy3 (Goat Anti-Rabbit IgG, F(ab') ₂)	Jackson, 111-166-047	G		1:1000	

Functional Role of the RET Dependence Receptor, GFRa Co-Receptors and Ligands in the Pituitary

Montserrat Garcia-Lavandeira · Esther Diaz-Rodriguez ·
Maria E.R. Garcia-Rendueles · Joana S. Rodrigues ·
Sihara Perez-Romero · Susana B. Bravo · Clara V. Alvarez

Department of Physiology, School of Medicine, IDIS University of Santiago de Compostela (USC), Santiago de Compostela, Spain

Abstract

The RET receptor is a tyrosine kinase receptor implicated in kidney and neural development. In the adenopituitary RET and the co-receptor GFRa1 are expressed exclusively in the somatotrophs secreting GH. RET is implicated in a clever pathway to maintain at physiological levels the number of somatotrophs and the GH production. Thus, in absence of its ligand GDNF, RET induces apoptosis through massive expression of Pit-1 leading to p53 accumulation. In the presence of the ligand GDNF, RET activates its tyrosine kinase and promotes survival at the expense of reducing Pit-1 expression and downregulating GH. Recent data suggest that RET can also have a second role in pituitary plasticity through a second co-receptor GFRa2.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

The pituitary is an endocrine gland in which specialized cells secrete hormones. In everyday life and also to adapt to puberty, pregnancy or hypothyroidism, the pituitary must regulate specifically and independently each secretory cell-type, not only through the release of hormones but also by regulating cell numbers [1]. Recent data implicate the RET receptor as one of the players in the control of such plasticity in the pituitary.

RET Receptor, Its Co-Receptors and Its Ligands

The RET receptor is a membrane receptor having an extracellular, a transmembrane and a cytoplasmic domain. Although originally discovered as an oncogene in

a transfected cell-line [2], RET was soon detected as an endogenous gene, strongly expressed in the central nervous system (CNS), lymphatic organs and testis [3, 4]. RET is a long protein, expressed as two isoforms due to alternative splicing [5]. From the common glycine 1063 in the C-terminal cytoplasmic domain, the RET long isoform (RET-L) contains 51 amino acids while the RET short isoform (RET-S) has only 9 amino acids. Since its discovery, RET has been considered a classical tyrosine-kinase receptor that upon binding to its ligand, GDNF, cross-dimerizes and autophosphorylates some tyrosines (Y) in the C-terminal tail [6–8], thus attracting and activating other target proteins. In order to bind GDNF, RET needs a co-receptor known as GFRa1. This co-receptor is a protein bound to the extracellular side of the plasma membrane through a glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) anchor that helps RET to bind the ligand. A surprising further discovery was that of three other ligands and co-receptors in addition to GDNF/GFRa1 that are able to activate RET: neurturin (NTN) and GFRa2, artemin (ART) and GFRa3 and persephin (PSP) and GFRa4 (reviewed in [9]) (fig. 1). As a consequence, a complex puzzle has begun to be revealed in which RET activates different transduction pathways, depending partly on the ligand/GFRa that it is bound to but mainly on the cell-type involved. Although much work remains in order to fully characterize the RET system, one recurrent pathway activated by GFRa/RET is the PI3K/AKT complex [10].

The function of the normal RET receptor has been intensely studied in neurons and in kidney development. In relation to human pathology, sporadic RET translocations have been implicated in the etiology of papillary thyroid carcinoma (RET/PTC). At least ten RET/PTC variants have been described in which the RET tyrosine-kinase domain is fused to other genes, although only RET/PTC1 (fused to the 5' end of the CCDC6 gene) and RET/PTC3 (fused with the NCOA4 gene) are common [11, 12].

More than 110 congenital RET mutations are also well known for causing two diseases in humans: Hirschprung's disease and MEN2. In Hirschprung's disease, or colonic aganglionosis, mutations are considered as inactivating RET function while in the MEN2 variants MEN2A, MEN2B and FMTC mutations are considered as activating RET function. However, it is not well explained how certain mutations can cause both Hirschprung's disease and MEN2 [13, 14].

GDNF/GFRa1/RET System in the Pituitary

Some years ago mutations in RET or GDNF were excluded as a cause of pituitary adenomas [15]. At that time, however, there had not been any studies of the expression of these genes in the normal pituitary. Our group described for the first time the expression patterns of RET, GFRa1 and GDNF in the rat pituitary, at both mRNA and protein levels [16]. Using double-immunofluorescence, an interesting observation was made: the only cells in the adenopituitary expressing the receptors GFRa1/RET were the somatotrophs, all other secretory cell types being negative [16]. Similar

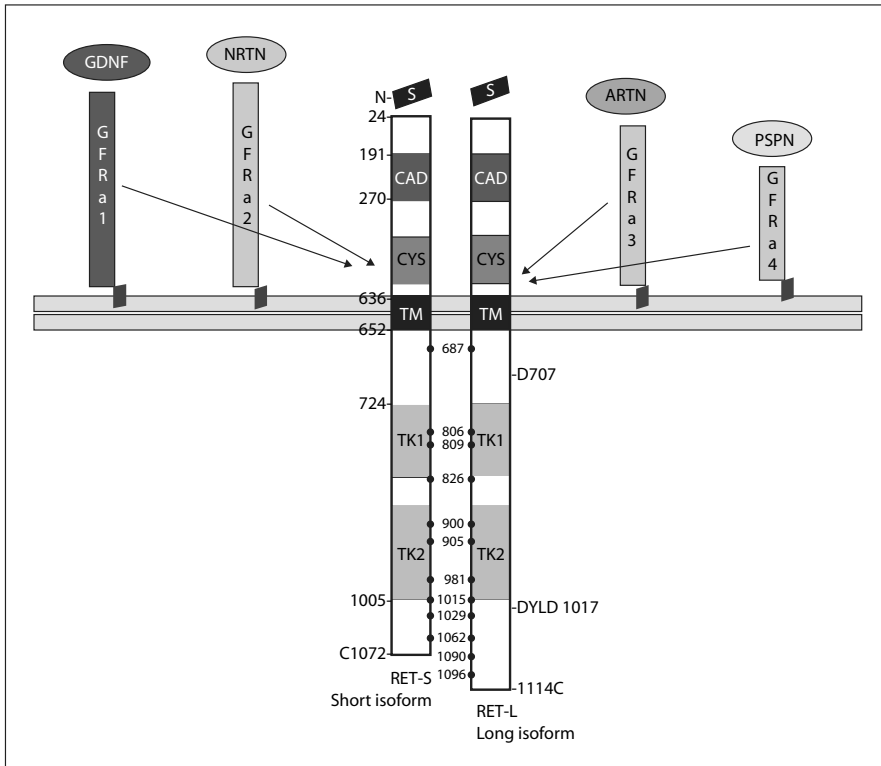


Fig. 1. The RET/GFRa system. The tyrosine-kinase receptor RET has an extracellular region with consensus cadherin-type domain, and a cysteine-rich domain. After the transmembrane domain (TM), the cytoplasmic tail contains the tyrosine-kinase domain. In the presence of any of its four GFRa extracellular co-receptors (GFRa 1–4) and ligands (GDNF, NRTN, ART and PSP), RET crossdimerize activating its tyrosine-kinase activity. The main tyrosines phosphorylated upon activation are shown. Also shown are the key aspartic (D) amino acids in the two putative consensus caspase-sensitive cleavage domains found within the cytoplasmic tail.

studies in human pituitary have shown the same result. The GDNF/GFRa1/RET system has also been shown to be expressed in the adenopituitary and again specifically in somatotrophs [17] (fig. 2).

Two questions arose directly from those expression studies: what is the role of RET in the somatotrophs, and what conserved mechanism(s) underly the distinctive expression of RET in mammalian pituitary somatotrophs? To study the function of RET in somatotrophs, we began by using a more simple system than that of the whole organ. Some rat pituitary cell-lines maintain the ability to synthesize and secrete hormones, even though they have lost some important receptors for hypothalamic factors [18]. We used the GH4C1 cell line which maintains the ability to secrete

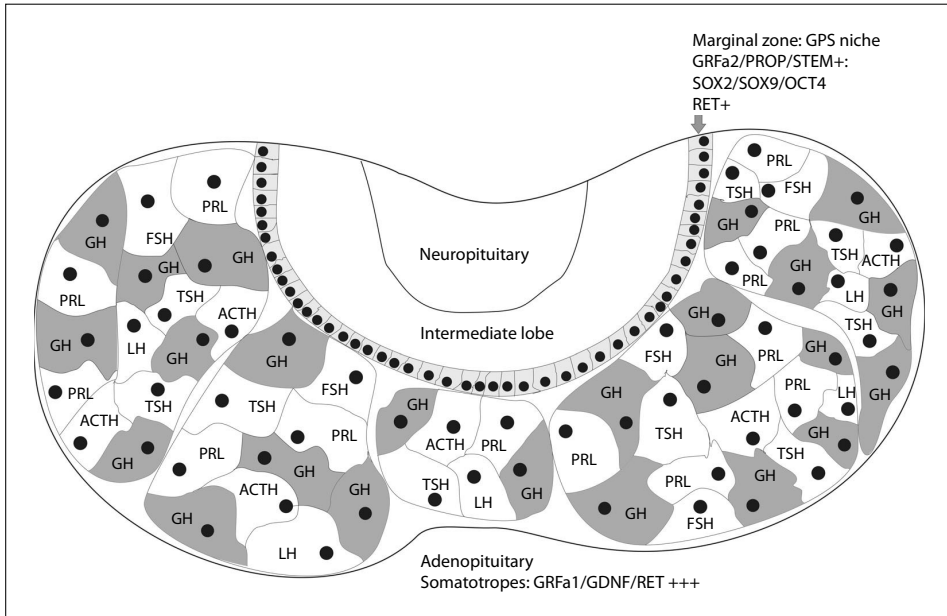


Fig. 2. Expression of RET in the pituitary. Somatotrophs, but not other secretory cells, express RET and GFRa1 (dark grey). In the marginal zone between Adenopituitary and Intermediate lobe the GPS niche of stem cells express RET although less intense (light grey). These cells do not express GFRa1 but instead they are intensively expressing the GFRa2 co-receptor in addition to stem markers such as Prop1, Oct4, Sox2 and Sox9.

GH and express GHSR receptors although it does not express GHRH receptors, and furthermore, while GH4C1 cells express GDNF and GFRa1, they do not express the RET receptor [19]. Although in transient transfected GH4C1 cells we could detect RET expression, we were unable to obtain a GH4C1 population that stably expressed RET. Through detailed studies we were able to demonstrate a strong apoptotic action of RET in GH4C1 somatotrophs that was blocked by the ligand GDNF, inducing survival. Apoptosis was induced by both isoforms RET-L and RET-S, while GDNF inhibited cell death in the presence of either receptor [19].

RET as a Member of the Family of Dependence Receptors

Some years ago a new type of receptor was described. These receptors are processed in the absence of their ligand and induce cell-death through apoptotic pathways. In the presence of the ligand the receptor remains whole and becomes activated in its classical transduction pathways, phosphorylating or activating other intracellular proteins.

Such receptors were called 'dependence receptors' since the cells in which they were expressed were absolutely dependent on the presence of their ligand for their survival (reviewed in [20–22]). Members of this family are the DCC and UNC5H2 receptors for netrin I, some integrins, the PTC receptor for SHH and the androgen receptor. During the last years, there was a suggestion that RET could be acting as a dependence receptor in some cell-lines [23].

To Die of Success: RET Kills through PIT Overexpression

Our data in GH4C1 somatotrophs, where RET induced apoptosis while GDNF induced survival, placed RET as a dependence receptor in somatotrophs but did not explain the mechanism. In parallel, we studied the expression of genes phenotypically characteristic of somatotrophs such as PIT (POU1F1, PIT-1). RET transfection induced a marked and sustained increase in PIT both at the mRNA and protein levels, and GDNF also blocked this action [19]. The tyrosine-kinase activity of RET was not required for these actions. When the same cells were transfected with a kinase-dead mutant receptor, apoptosis or PIT induction were still induced. However, GDNF failed to induce survival in the presence of this mutant, demonstrating the requirement of the tyrosine-kinase pathway to survival.

One property common to all dependence receptors is their processing by intracellular caspases [20]. In GH4C1, RET presence was positively correlated with caspase-3 activation, while a RET point mutant of one of the two caspase-3 putative consensus sites could not induce apoptosis. Surprisingly, however, PIT induction was also blocked. Indeed, PIT induction by normal RET was blocked by caspase-3 inhibitors. Through a series of experiments, the data pointed to a relationship between strong PIT induction and apoptosis. Finally, we compared transfection of PIT with RET and with both PIT and RET together. All three experiments gave comparable levels of apoptosis without any additive effects. In fact, RET-induced PIT overexpression led to p53 accumulation and cell death [19]. Opposite PIT siRNA blocked either PIT or RET-induced p53 expression and apoptosis, demonstrating a direct relationship between both proteins.

We then tried to elucidate the cytoplasmic pathway from RET to PIT. Through a series of complex co-immunoprecipitations, we demonstrated that RET forms an intracellular complex with caspase-3 and the protein kinase PKC-delta (PKCd) on the cytoplasmic surface of the plasma membrane. Either caspase-3 or PKCd need to be cleaved and phosphorylated to become activated [24–26]. In one previous publication, caspase-3 and PKCd had been found to form a complex [27]. In somatotrophs, the presence of the intracellular tail of undimerized RET initiates both the formation of the complex itself and the proteolytic processing of the three proteins that generates an 18-kDa caspase-3 (full length 30 kDa), a 40-kDa PKC-d (full length 80 kDa) and a 55-kDa intracellular RET fragment (IC-RET; RET full length is 150–170 kDa).

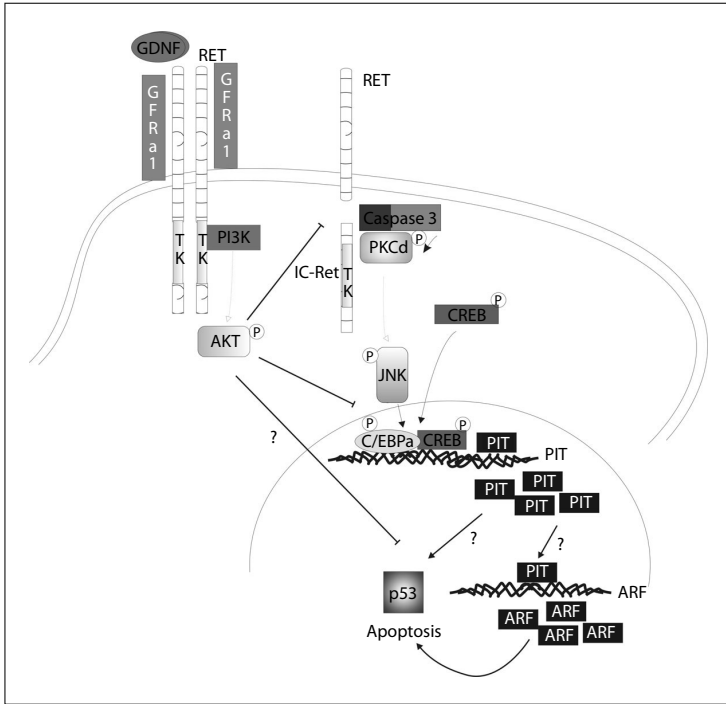


Fig. 3. The RET/PIT/p53 pathway opposite the RET/GFRa1/GDNF pathway in the somatotroph cell. Caspase-3 processed IC-Ret regulates somatotroph differentiation by potently inducing Pit-1 expression. Ret induced Pit-1 overexpression, leads to increased p53 expression and apoptosis. The Pit-1 overexpression is mediated by sustained activation of PKC δ , JNK, C/EBP α and CREB. In the presence of GDNF, however, Akt is activated and the RET-processing, the Pit-1 over-expression, and consequent apoptosis, is blocked.

Immediately afterwards, two other proteins become phosphorylated and activated, the kinase JNK and the transcription factor CREB. Both phosphorylations depend on PKC δ phosphorylation to become activated since rottlerin, a specific PKC δ inhibitor, prevents JNK or CREB phosphorylation, PIT induction and apoptosis [19]. On the other hand, addition of GDNF causes dimerization and activation of RET tyrosine-kinase, preventing intracellular processing of the receptor – or indeed of other proteins – and leading to AKT phosphorylation, thus blocking apoptosis and leading to cell survival. Inhibitors of p-AKT, even in the presence of GDNF, again lead to apoptosis (fig. 3).

Previously, our group had demonstrated an induction of the PIT expression at the promoter level by GHRH [28] or by ghrelin [29]. Both effects were transient and rapid, lasting not more than two hours, and were exerted at the two CRE-response elements (around -200 bp) on the PIT promoter. These results raised many questions

since the tandem CRE-sites exist only in the murine PIT promoter and are not conserved in the human PIT promoter. We now understand the importance of GHRH or ghrelin activation of the PIT promoter for a rapid response, since a more chronic PIT induction leads to apoptosis. In fact, both GHRH and ghrelin were able to activate p-AKT at the same time as activating the cAMP/CREB pathway. We now think that this ability is the key factor in the swiftness of GHRH/ghrelin action at the PIT promoter, since GDNF, the ligand inducing RET dimerization and tyrosine-kinase activity, inhibits PIT transcription through p-AKT.

When we started to study PIT-promoter activation via RET we thought that the tandem CRE region would also be implicated, since RET induced CREB phosphorylation. However, the promoter region implicated in the PIT induction was an element at -300 bp. This new region was a consensus site for c/EBP alpha (c/EBPa), a leucine zipper transcription factor of fundamental importance during embryonic development [30–33]. In vitro studies related c/EBPa in the pituitary with transcriptional activation of PRL and GH genes [34–37]. Importantly, the c/EBPa site is conserved in both murine and human PIT promoters. Using chromatin immunoprecipitation studies, we demonstrated the specific binding of c/EBPa and CREB to this region of the PIT promoter after RET transfection, which was blocked by GDNF, caspase-3 inhibitors, rottlerin or the dominant-negative mutant killer-CREB [19] (fig. 3).

Importance of the RET Pathway in vivo: RET KO Pituitary and Prevention of Tumor Growth

Our results in the GH4C1 cell line were easily reproduced in primary pituitary cultures with the advantage that the endogenous receptor was present. In these cultures more than 60% of the cells are somatotrophs. Immediately after replacing the culture medium with a low serum medium, an immediate processing of the endogenous RET receptor was observed, with caspase-3/PKCd activation and strong PIT induction leading to massive apoptosis [19]. All these events were prevented by the addition of GDNF which induced RET tyrosine-kinase activity and p-AKT activation.

The RET KO mouse has a strong phenotype with profound alterations in the kidneys and reproductive system. Moreover, animals die within a few hours of birth due to failure in peristalsis and digestion due to the absence of parasympathetic innervation in the intestines [38]. Depending on how important the RET pathway is in pituitary embryonic development relative to its importance in pituitary maintenance after birth, we could predict a RET KO phenotype. Therefore, we characterized the pituitaries of wild-type and RET KO newborn mice. The pituitaries of the RET KO were bigger both in total volume and surface area per section. But this enlargement was entirely within the adenopituitary (AP), with the intermediate lobe and neuropituitary showing no difference in size compared with the wild-type pituitary. Proliferative activity was also no different in the two mice genotypes. When all pituitary secretory-

cell types were analyzed, PIT-expressing cells were found in significantly increased numbers in the RET KO pituitaries, while SF-1 (gonadotroph) cells were identical in number in the KO as in the wild type. Finally, somatotrophs were the only Pit1+ secretory cell-type that increased in number, with no differences being found for either lactotrophs or thyrotrophs [19]. Interestingly, c/EBPa KO mice, like RET KO mice, also die after birth of hypoglycemia and lung deficiencies [32, 33]. It will be important to investigate in the future whether or not this KO also has a pituitary phenotype.

Although somatotrophs are the most abundant cells in the pituitary, somatotrophic tumors are the least frequent. Furthermore, in aggressive adenomas and pituitary carcinomas, somatotroph adenomas are an uncommon source. We wanted to investigate whether the RET/PIT pathway was protecting somatotrophs against tumor growth, and if so, whether we could utilise this system to prevent growth in other pituitary tumors. Since there is not a good inducible model for somatotrophic tumors, we chose to induce a lactotroph adenoma through repeated estrogen injections. Lactotrophs do not express RET but they are PIT-expressing. We prepared retroviral particles bearing RET and control particles with an empty virus. We chose retroviruses as carriers of RET because they primarily infect proliferating cells and not resting differentiated cells, and would therefore specifically infect tumor cells. Using stereotactic techniques we injected the retrovirus precisely into the adenopituitary and waited a week. As expected, the pituitaries treated with estrogens and injected with control retrovirus weighed twice the amount of normal untreated pituitaries, with a high level of statistical significance. However, pituitaries treated with estrogens but injected with RET-expressing retrovirus showed no difference in weight compared with normal non-injected untreated pituitaries. Histological analysis showed lactotrophs expressing the RET receptor to be present in pituitaries treated with estrogens and infected with RET-expressing retroviruses, but not in normal pituitaries nor in pituitaries treated with estrogen but infected with empty viruses. Moreover, in extracts of pituitaries infected with the RET-expressing virus, but not in extracts of the empty-virus infected pituitaries, the presence of fragmented IC-RET, together with high levels of p-CREB and p-JNK, PIT and p53 were detected. RET infection was also accompanied by a strong tendency to apoptosis as detected through PARP cleavage [19]. Taken together, these data from a model of pituitary tumorigenesis strongly suggest the potential usefulness of the RET/PIT pathway in designing new drugs for pituitary tumor treatment (fig. 4).

More Questions for Future Answers

The RET/PIT/p53 pathway is a relatively well understood mechanism for the precise control of the number and function of somatotrophs. There are, however, still some particular questions that need to be answered. The first is the exact nature of the IC-RET/PKCd/caspase-3 complex. Is caspase-3 only acting as a protease, processing/activating both RET and PKCd to phosphorylate JNK/CREB? Or may the opposite

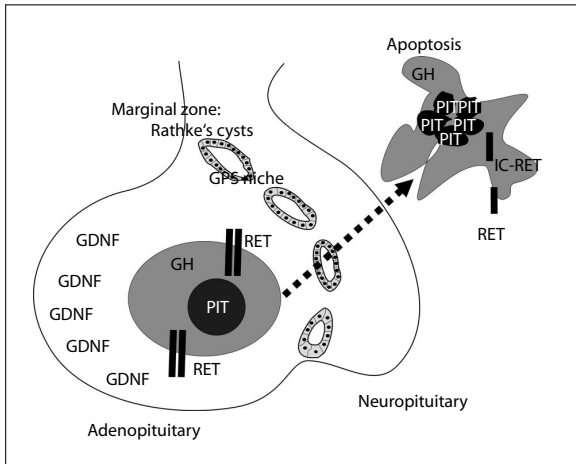


Fig. 4. Importance of the pathway to prevent somatotroph tumors in humans. Somatotrophs are under strong pressure to stay in the pituitary. If a precursor cell is to become a somatotroph, a GH-secreting cell, it needs Pit-1, and to maintain sufficient Pit-1 expression after birth, Ret expression is required. But if the somatotroph migrates outside the pituitary, to tissues in which GDNF is present at much lower concentrations, Ret-induced Pit-1 overexpression will kill it. This would further explain why all GH-secreting adenomas maintain normal Ret/GFRa1 and GDNF expression, and why GH-secreting adenomas are incapable of metastasis. The human pituitary has also a GPS niche in the marginal zone, where progenitors expressed similar stem-cell markers and RET as the murine GPS niche.

be true: is IC-RET activating caspase-3, such that, instead of processing RET/PKCD, it would be able to activate other apoptotic pathways? Our results strongly suggest that the first is true, but more detailed biochemical studies are needed to precisely elucidate the nature of the ternary complex. A second important point would be to determine at the DNA level the exact contribution of the two transcription factors implicated in the PIT activation, c/EBPa and CREB: whether they are pre-assembled, bind upon activation or contribute independently to PIT activation. Another area for future study is to investigate how PIT can lead to stabilization of p53, and especially whether this is a direct effect or mediated by other known or unknown genes.

It is also important that the RET/PIT/p53 pathway has been conserved through evolution. Our data appear to be common in the rodent and human pituitary. From studies in zebrafish, birds, rodents, cattle, monkeys and humans, it has also been demonstrated that the RET tyrosine-kinase receptor is one of the most evolutionarily conserved receptors, having an average of only 1.3 substitutions per position per 100 million years [39]. The intracellular region IC-RET is, furthermore, the most conserved part of the receptor as a whole. More studies of the evolutionary aspects of the pituitary are needed, and it is encouraging for future work that RET is expressed in the pituitary of zebrafish [40].

It will also be interesting to elucidate pathways used by other secretory cell-types in the pituitary. The fact that RET is not expressed in non-somatotroph cell types precludes its involvement, but other members of the family of dependence receptors could still be regulating survival and function of lactotrophs, thyrotrophs, corticotrophs or gonadotrophs. Alternatively, perhaps only the somatotrophs need such specific regulation due to the nature of the hormone they secrete acting in the body as a whole rather than on a specific target organ. Thus the RET/GFRa1/PIT system would help to prevent somatotroph tumors. The somatotroph needs RET to maintain the PIT and GH expression over a longer period. More GDNF within the pituitary would result in more somatotrophs surviving but less PIT and less GH being expressed per cell. Any somatotroph leaving pituitary areas rich in GDNF would in effect be committing suicide. The data obtained in human pituitary adenomas fit with this hypothesis. In our experimental series, all somatotroph adenomas tested maintained their expression of RET/GFRa1 and GDNF [17]. Furthermore, it is known that somatotroph adenomas are less frequent than other types of adenomas, in spite of somatotrophs making up more than half the total number of secretory cells in the normal pituitary. Coincidentally, in a recent review on human aggressive pituitary tumors and carcinomas [Colao et al., this vol., pp. 94–108], the tumors least likely to have an aggressive phenotype were somatotroph tumors. This fact also highlights the likely importance of the RET/GFRa1/PIT pathway to pituitary tumor treatment or diagnosis in the future.

Finally, it should be remembered that RET has three other ligands and GFRa co-receptors. Some of these are expressed on the adenopituitary [unpubl. data from our group]. Additionally, our group has recently demonstrated the existence of a niche of stem cells, conserved in the murine and human pituitary. We have called this the GPS niche since the small cells within it express the RET co-receptor GFRa2, the pituitary transcription factor Prop1 and stem cell markers such as Sox2, Sox9 and Oct4 [41]. These cells are also weakly positive for RET. GPS cells have stem cell characteristics both in vivo and in vitro, and some animal models of hypopituitarism due to alteration of cell cycle proteins [42] present a phenotype in the GPS niche [41]. The relationship between cell-cycle proteins and stem cells of the pituitary has been recently started to be unveiled [43]. Therefore, the study of RET/GFRa2 in the GPS niche and its importance to the pituitary physiology will make for an interesting future in this field.

Acknowledgements

We thank Carlos Dieguez for helpful scientific discussions and suggestions. We thank Pamela Lear for its expert reading and corrections of scientific English.

This work was funded by grants from the Xunta de Galicia PGIDIT 05BTF20803PR, 06PPXIB208107PR, 2006/PX259 and 2009/PX23; from the Ministry of Education and Science (MICINN) SAF2004–03131 and BFU2007–60571.

References

- 1 Melmed S: Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest* 2003;112:1603–1618.
- 2 Takahashi M, Ritz J, Cooper GM: Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 1985;42:581–588.
- 3 Tahira T, Ishizaka Y, Sugimura T, Nagao M: Expression of proto-ret mRNA in embryonic and adult rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;153:1290–1295.
- 4 Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y, Ikeda H, Hiai H: Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 1988; 3:571–578.
- 5 Tahira T, Ishizaka Y, Itoh F, Sugimura T, Nagao M: Characterization of ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line. *Oncogene* 1990;5: 97–102.
- 6 Takahashi M, Cooper GM: Ret Transforming Gene Encodes a Fusion Protein Homologous to Tyrosine Kinases. *Mol Cell Biol* 1987;7:1378–1385.
- 7 Jing S, Wen D, Yu Y, et al: GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996;85:1113–1124.
- 8 Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, et al: Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 1996;382:80–83.
- 9 Airaksinen MS, Saarma M: The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:383–394.
- 10 Santoro M, Carlomagno F, Melillo RM, Fusco A: Dysfunction of the RET receptor in human cancer. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2954–2964.
- 11 Pierotti MA, Santoro M, Jenkins RB, et al: Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and RET and creating the oncogenic sequence RET/PTC. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1616–1620.
- 12 Bongarzone I, Butti MG, Coronelli S, et al: Frequent activation of ret proto-oncogene by fusion with a new activating gene in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res* 1994;54:2979–2985.
- 13 Arighi E, Popsueva A, Degl'Innocenti D, et al: Biological effects of the dual phenotypic Janus mutation of ret cosegregating with both multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. *Mol Endocrinol* 2004;18:1004–1017.
- 14 Plaza-Menacho I, Burzynski GM, de Groot JW, Eggen BJ, Hofstra RM: Current concepts in RET-related genetics, signaling and therapeutics. *Trends Genet* 2006;22:627–636.
- 15 Yoshimoto K, Tanaka C, Moritani M, et al: Infrequent detectable somatic mutations of the RET and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) genes in human pituitary adenomas. *Endocr J* 1999;46:199–207.
- 16 Urbano AG, Suarez-Penaranda JM, Dieguez C, Alvarez CV: GDNF and RET-gene expression in anterior pituitary-cell types. *Endocrinology* 2000; 141:1893–1896.
- 17 Japon MA, Urbano AG, Saez C, et al: Glial-derived neurotrophic factor and RET gene expression in normal human anterior pituitary cell types and in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87: 1879–1884.
- 18 Coya R, Alvarez CV, Perez F, Gianzo C, Dieguez C: Effects of TGF-beta1 on prolactin synthesis and secretion: an in-vitro study. *J Neuroendocrinol* 1999;11:351–360.
- 19 Canibano C, Rodriguez NL, Saez C, et al: The dependence receptor Ret induces apoptosis in somatotrophs through a Pit-1/p53 pathway, preventing tumor growth. *EMBO J* 2007;26:2015–2028.
- 20 Mehlen P, Thibert C: Dependence receptors: between life and death. *Cell Mol Life Sci* 2004;61: 1854–1866.
- 21 Allouche M: ALK is a novel dependence receptor: potential implications in development and cancer. *Cell Cycle* 2007;6:1533–1538.
- 22 Bernet A, Fitamant J: Netrin-1 and its receptors in tumour growth promotion. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12:995–1007.
- 23 Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, et al: The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J* 2000;19: 4056–4063.
- 24 Majumder PK, Pandey P, Sun X, et al: Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:21793–21796.
- 25 Sun X, Wu F, Datta R, Kharbanda S, Kufe D: Interaction between protein kinase C delta and the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2000;275:7470–7473.
- 26 Liu H, Lu ZG, Miki Y, Yoshida K: Protein kinase C delta induces transcription of the TP53 tumor suppressor gene by controlling death-promoting factor Btf in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 2007;27:8480–8491.
- 27 Voss OH, Kim S, Wewers MD, Doseff AI: Regulation of monocyte apoptosis by the protein kinase Cdelta-dependent phosphorylation of caspase-3. *J Biol Chem* 2005;280:17371–17379.

- 28 Soto JL, Castrillo JL, Dominguez F, Dieguez C: Regulation of the pituitary-specific transcription factor GHF-1/Pit-1 messenger ribonucleic acid levels by growth hormone-secretagogues in rat anterior pituitary cells in monolayer culture. *Endocrinology* 1995;136:3863–3870.
- 29 Garcia A, Alvarez CV, Smith RG, Dieguez C: Regulation of Pit-1 expression by ghrelin and GHRP-6 through the GH secretagogue receptor. *Mol Endocrinol* 2001;15:1484–1495.
- 30 Lin FT, MacDougald OA, Diehl AM, Lane MD: A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9606–9610.
- 31 Lin FT, Lane MD: CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8757–8761.
- 32 Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, et al: Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 1995;269:1108–1112.
- 33 Flodby P, Barlow C, Kylefjord H, Ahrlund-Richter L, Xanthopoulos KG: Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein alpha. *J Biol Chem* 1996;271:24753–24760.
- 34 Schaufele F: CCAAT/enhancer-binding protein alpha activation of the rat growth hormone promoter in pituitary progenitor GHFT1–5 cells. *J Biol Chem* 1996;271:21484–21489.
- 35 Jacob KK, Stanley FM: CCAAT/enhancer-binding protein alpha is a physiological regulator of prolactin gene expression. *Endocrinology* 1999;140:4542–4550.
- 36 Day RN, Voss TC, Enwright JF 3rd, Booker CF, Periasamy A, Schaufele F: Imaging the localized protein interactions between Pit-1 and the CCAAT/enhancer binding protein alpha in the living pituitary cell nucleus. *Mol Endocrinol* 2003;17:333–345.
- 37 Enwright JF 3rd, Kawecki-Crook MA, Voss TC, Schaufele F, Day RN: A PIT-1 homeodomain mutant blocks the intranuclear recruitment of the CCAAT/enhancer binding protein alpha required for prolactin gene transcription. *Mol Endocrinol* 2003;17:209–222.
- 38 Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V: Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 1994;367:319–320.
- 39 Kashuk CS, Stone EA, Grice EA, et al: Phenotype-genotype correlation in Hirschsprung disease is illuminated by comparative analysis of the RET protein sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:8949–8954.
- 40 Fisher S, Grice EA, Vinton RM, Bessling SL, McCallion AS: Conservation of RET regulatory function from human to zebrafish without sequence similarity. *Science* 2006;312:276–279.
- 41 Garcia-Lavandeira M, Quereda V, Flores I, et al: A GRFa2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary. *PLoS ONE* 2009;4:e4815.
- 42 Quereda V, Malumbres M: Cell cycle control of pituitary development and disease. *J Mol Endocrinol* 2009;42:75–86.
- 43 Bilodeau S, Roussel-Gervais A, Drouin J: Distinct developmental roles of cell cycle inhibitors p57Kip2 and p27Kip1 distinguish pituitary progenitor cell cycle exit from cell cycle reentry of differentiated cells. *Mol Cell Biol* 2009;29:1895–1908.

Clara V. Alvarez
 Department of Physiology, School of Medicine, IDIS University of Santiago de Compostela (USC)
 c/ San Francisco s/n
 ES-15782 Santiago de Compostela (Spain)
 Tel. +34 981 582658, Fax +34 981 574145, E-Mail clara.alvarez@usc.es

A GRFa2/Prop1/Stem (GPS) Cell Niche in the Pituitary

Montse Garcia-Lavandeira¹, Víctor Quereda², Ignacio Flores³, Carmen Saez⁴, Esther Diaz-Rodriguez¹, Miguel A. Japon⁴, Aymee K. Ryan⁵, Maria A. Blasco³, Carlos Dieguez^{1,6}, Marcos Malumbres^{2*}, Clara V. Alvarez^{1*}

1 Department of Physiology, School of Medicine, University of Santiago de Compostela (USC), Santiago de Compostela, Spain, **2** Cell Division and Cancer Group, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain, **3** Telomeres and Telomerase Group, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain, **4** Department of Pathology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain, **5** Department of Human Genetics, McGill University (MUHC), Montreal, Quebec, Canada, **6** CIBER Obesity & Nutrition (ISCIII), Santiago de Compostela, Spain

Abstract

Background: The adult endocrine pituitary is known to host several hormone-producing cells regulating major physiological processes during life. Some candidates to progenitor/stem cells have been proposed. However, not much is known about pituitary cell renewal throughout life and its homeostatic regulation during specific physiological changes, such as puberty or pregnancy, or in pathological conditions such as tumor development.

Principal Findings: We have identified in rodents and humans a niche of non-endocrine cells characterized by the expression of GRFa2, a Ret co-receptor for Neurturin. These cells also express b-Catenin and E-cadherin in an oriented manner suggesting a planar polarity organization for the niche. In addition, cells in the niche uniquely express the pituitary-specific transcription factor Prop1, as well as known progenitor/stem markers such as Sox2, Sox9 and Oct4. Half of these GPS (GRFa2/Prop1/Stem) cells express S-100 whereas surrounding elongated cells in contact with GPS cells express Vimentin. GRFa2+ cells form non-endocrine spheroids in culture. These spheroids can be differentiated to hormone-producing cells or neurons outlining the neuroectoderm potential of these progenitors. In vivo, GPS cells display slow proliferation after birth, retain BrdU label and show long telomeres in its nuclei, indicating progenitor/stem cell properties in vivo.

Significance: Our results suggest the presence in the adult pituitary of a specific niche of cells characterized by the expression of GRFa2, the pituitary-specific protein Prop1 and stem cell markers. These GPS cells are able to produce different hormone-producing and neuron-like cells and they may therefore contribute to postnatal pituitary homeostasis. Indeed, the relative abundance of GPS numbers is altered in Cdk4-deficient mice, a model of hypopituitarism induced by the lack of this cyclin-dependent kinase. Thus, GPS cells may display functional relevance in the physiological expansion of the pituitary gland throughout life as well as protection from pituitary disease.

Citation: Garcia-Lavandeira M, Quereda V, Flores I, Saez C, Diaz-Rodriguez E, et al. (2009) A GRFa2/Prop1/Stem (GPS) Cell Niche in the Pituitary. PLoS ONE 4(3): e4815. doi:10.1371/journal.pone.0004815

Editor: Jose A. L. Calbet, University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain

Received: May 18, 2008; **Accepted:** January 27, 2009; **Published:** March 13, 2009

Copyright: © 2009 Garcia-Lavandeira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: V.Q. was supported by a fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science. This work was funded by grants from the Foundation of the Asociación Española contra el Cáncer (AECC; to M.M.), Fundación Mutua Madrileña Automovilista (to M.M.), Xunta de Galicia PGIDIT05BTF20803PR (to C.V.A. and C.D.) and the Ministry of Education and Science (MICINN; SAF2004-03131 and BFU2007-60571 to C.V.A. and SAF2006-05186, to M.M.). The Cell Division and Cancer Group of the CNIO is supported by the OncoCycle programme from the Comunidad de Madrid (S-BIO-0283-2006) and the Consolider-Ingenio (CSD2007-00017) program from the MICINN. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: malumbres@cnio.es (MM); clara.alvarez@usc.es (CVA)

Introduction

The pituitary gland is a central endocrine organ that regulates basic physiological functions such as growth, stress response, reproduction, lactation and metabolic homeostasis. The adenopituitary (AP) hosts several endocrine cell types secreting hormones that regulate the function of other organs and endocrine glands throughout life. Thus, somatotrophs, lactotrophs and thyrotrophs secrete growth hormone (GH), prolactin (PRL), and thyroid-stimulating hormone (TSH) respectively; corticotrophs secrete adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and gonadotrophs secrete luteinizing hormone (LH) and/or follicle-stimulating hormone (FSH). In addition, some non-hormonal folliculostellate cells have been described whose function is not well understood [1–3]. All these cells in the AP arise during development from a common

ectodermal primordium known as the Rathke's pouch [4]. However, not much is known on pituitary cell renewal throughout life and its homeostatic regulation during specific physiological changes such as puberty or pregnancy or in pathological conditions such as tumor development. To explain these changes, both cell proliferation of the individual differentiated secretory cells and asymmetric proliferation followed by terminal differentiation of adult stem cells have been proposed [5,6].

Although the identity of adult pituitary stem cells is not well established, several stem/progenitor cell types have been previously proposed to maintain pituitary homeostasis and generate endocrine cells. A side population (SP) that efficiently excludes the Hoechst 33342 vital dye has been shown to segregate with sphere-forming cells in the pituitary [7]. In addition, pituitary colony-forming cells (PCFCs) that display notable clonogenic potential

have also been isolated [8]. However, the only common marker studied for these cells was *Scal* and their position in the pituitary was not well understood [7,9]. Recently, the presence of *Sox2+*/*Sox9-* of the mouse pituitary has been described and proposed to mark stem cells, localized both as an epithelial layer but also heavily intermingled with the differentiated cells [10], while more differentiated progenitors or transit-amplifying cells would become *Sox2+*/*Sox9+*. Genetic approaches using transgenic mice expressing GFP under the *Nestin* promoter identified a population of *Nestin+* cells that *in vitro* behaves as progenitors; however, these cells would only contribute post-puberally to cell-renewal in the adult pituitary [11].

In this manuscript we describe a niche of putative stem cells that express the Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor alpha 2 (GFRa2). GFRa2 belongs to a family of receptors (GFRa1-4) that modulate signaling pathways initiated by their ligands, GDNF, Neurturin (NTN), Artemin (ART) and Persephin (PSP). These proteins function as co-receptors of the tyrosine kinase Ret [12–14]. GFRa2 functions as an specific NTN receptor as demonstrated *in vivo* by the almost identical phenotype of mice deficient in either NTN or GFRa2 [15,16]. In some tissues such as testis and ovary, GFRa1 and 2 receptors are expressed in putative germ-line stem cells [17–19]. In the pituitary, somatotrophs (GH) are the only secretory cells expressing Ret and GFRa1 either in rat [20] or in humans [21]. We report here that GFRa2 is expressed in a niche of non-hormonal putative stem/progenitor cells in the pituitary. GFRa2-positive (GFRa2+) cells are organized in a single-cell layer around the cleft originated from the Rathke's pouch. These niche cells display a clear expression of the pituitary specific homeobox protein *Prophet of Pit1* (Prop1), a transcription factor required for pituitary development and mutated in pituitary disease [22–26]. In addition, these niche cells also express well-established stem cell markers such as Oct4, Sox2, Sox9 and we will refer to them as GPS (GFRa2+, Prop1+, Stem) cells.

Results

GFRa2 expression is mostly restricted to a polarized niche in the pituitary

GFRa2 is expressed in the rat pituitary at similar levels to testis (Figure S1A) or ovary (data not shown), two other endocrine glands where GFRa1 and 2 receptors had been previously described [17–19]. In the murine pituitary, GFRa2 expression is restricted to a distinct subset of non-endocrine cells lined to a single-cell layer in the marginal zone (MZ) around the cleft between the intermediate lobe (IL) and the AP (Figure 1). The MZ had been proposed to harbor stem/progenitor cells originated from the Rathke's pouch from which the endocrine cells could be produced but still no clear proof has been found [5,9]. This layer of cells opposed to the cleft originates, like the AP, from the Rathke's pouch formed from the oral ectoderm during embryonic development. A very limited number of isolated GFRa2+ cells are distributed throughout the AP (Figure 1A). In total, GFRa2+ cells accounts for about 0.9% cells of the adult mouse pituitary (Figure S1B). GFRa2+ cells do not express any pituitary hormone (Figure 1B) but shows a significant expression of epithelial markers such as Cytokeratins and E-cadherin (Figure 1C–D and Table 1). These GFRa2+ cells also display a clear expression of b-Catenin (Figure 1C –rat- and D –mouse-), whose labeling is rarely positive in other cells of this endocrine gland (Figure S1-C). The GFRa2+ niche in the MZ seems to have a Planar Polarity organization. Thus, the anti-GFRa2 antibody stains a very thin line in the coronal axis of the MZ cells. However, GFRa2 stains broadly on MZ cells in the axial axis. Similar polarization is found with b-

Catenin where each cell appears as a U-shaped line in coronal sections versus complete rings in axial sections (Figure 1C and Videos S1 and S2). Interestingly, the GFRa2 (membrane) and b-Catenin (cytoplasm) signals are perpendicular (see Axial 400× and 1000× sections), suggesting that the GFRa2 cell niche is formed of cylindrical cells with Planar Polarity coordination, a specific coordination of an epithelial layer of cells to behave with a physiological direction (recently reviewed in [27]).

GFRa2+ cells express pituitary specific factors and stem cell markers in murine and human pituitaries

A variety of stem/progenitor cell markers is also expressed in the niche of GFRa2+ cells (Table 1). Among them, the recently described [10] *Sox 2* and *Sox9* transcription factors (Figure 2A –mouse- and 2B-rat-) that co-stain with GFRa2/b-Catenin. These cells also display a clear signal for Oct4 (Figure 2C).

GFRa2 cells does not express the pituitary specific transcription factor *Pit1* (Figure S2-A) but display a clear and specific signal for *Prop1* (Figure 2D). *Prop1* is a transcription factor known for its exclusive expression in pituitary development. Mutations in the *Prop1* gene cause hypopituitarism due to Combined Pituitary Hormone Deficiency (CPHD) in humans [23] and the Ames dwarfism in mice [22,25].

Based on the fact that GFRa2+ cells express a pituitary specific factor, *Prop1*, with clear physiological relevance (see Discussion), and *bona-fide* stem cell markers such as *Sox* and *Oct4* proteins, we call them GPS (GFRa2+, Prop1+, Stem). GFRa2+ cells also express SSEA4 (Figure 2E), a glycolipid marker of embryonic stem cells. However, the niche of cells is negative for other stem markers such as *Nanog* –expressed in the IL (Figure 2E) and S2B-, *Sox4*, *Isl-1* or *Pax6* (Figure S2 and Table 1). Whereas the other co-receptor, GFRa1, is not expressed in the GPS cells, they are positive for the Ret receptor although with less intensity than somatotrophs (Figure 2E and S2-C).

The calcium-binding protein S-100 (a marker of folliculostellate cells [28–30]) is present in about 50% of GPS cells, in addition to many scattered and elongated cells in the AP, MZ and IL (Figure 2F). Another marker of folliculostellate cells, *Vimentin* [31,32], delineates the GPS niche (Figure 2G). However, double immunofluorescence with beta-catenin does not show the expected co-localization. *Vimentin+* cells appear as a line of elongated cells posterior to the GPSs just before the IL both in rat and mouse pituitaries (Figure 2G, H). Finally, *Nestin*, a marker of some folliculostellate cells [33] is expressed in long and thin processes through the AP, IL and NP similar to neurons or to folliculostellate cells, but it does not correlate with GFRa2 staining (Figure 2I).

A similar niche of GPS cells, expressing GFRa2, Oct4, Sox2, Sox9 and is also present in the MZ of the human pituitary around the so called Rathke's remnant cysts (Figure 3A–B). The human pituitary also expresses *Prop1* (Figure 3C). The niche of human GPS is also partially positive for S-100 but negative for *Vimentin*, which is expressed by elongated cells in the same area just in contact with the GPS (Figure 3D). On the other hand, the GFRa2-specific ligand NTN is exclusively expressed in groups throughout the AP and not at the niche either in human or in rat pituitary (Figure 3E–F and Figure S2-F). This finding, together with the planar polarity found in the GPS niche, suggests a functional asymmetric signaling in which the GFRa2/RET/NTN pathway may be implicated.

GFRa2+ cells form embryonic-like spheroids capable to differentiate in hormone-producing cells

To address the differentiation potential of the GPS niche, we isolated GFRa2+ individual cells and maintained them as a

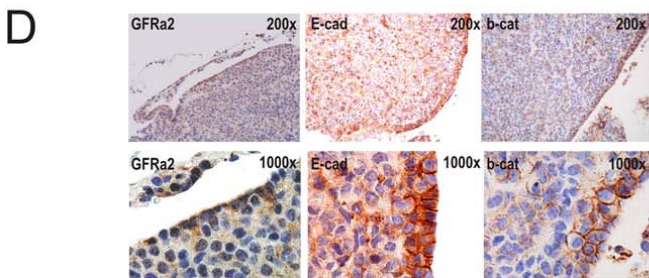
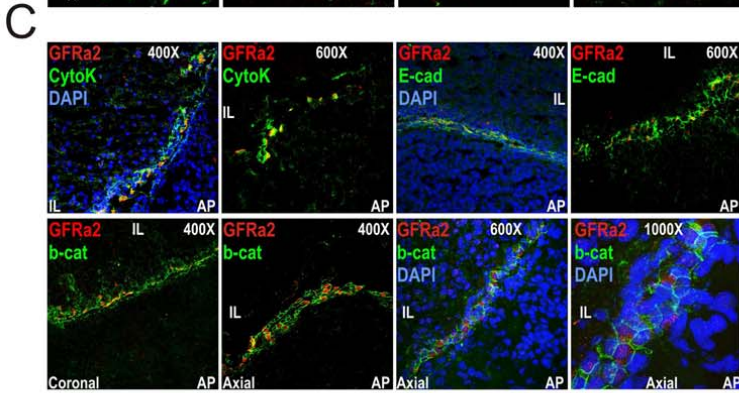
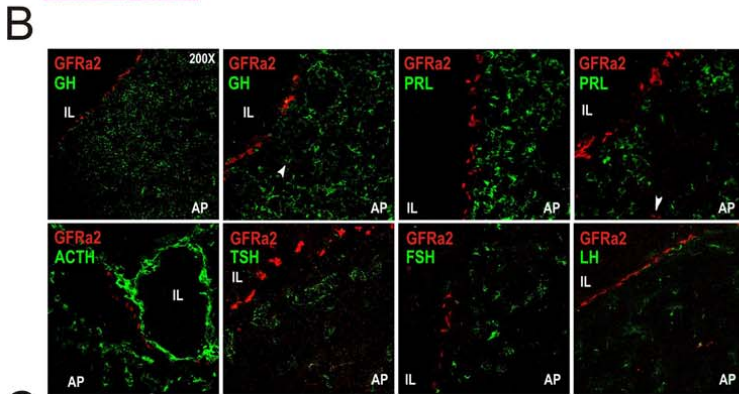
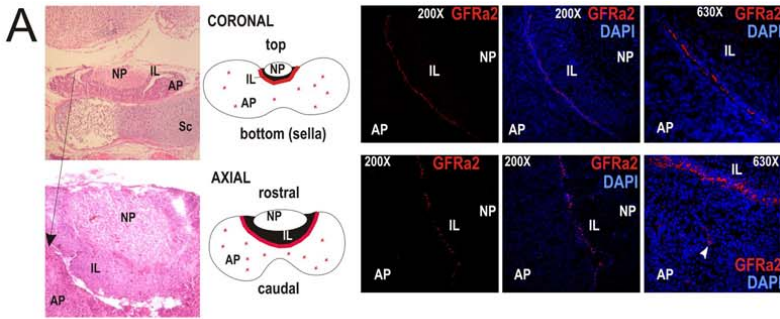


Figure 1. GFRa2+–expressing cells form a line of epithelial non-secretory cells in the adult pituitary of rats and mice. **A)** Coronal and axial sections stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) to show pituitary location under the hypothalamus and on top of the sphenoid sella turcica (Sc) and the disposition of the three pituitary lobes: adenopituitary (AP), intermediate lobe (IL) and neuropituitary (NP) where end-terminals of hypothalamic axons release ADH and Oxytocin. In the rat pituitary, GFRa2+ cells (red) arrange in a precise line in the frontier between the AP and the IL. Very few less intense cells are found dispersed through the AP (arrowhead). **B)** GFRa2+ cells [either lined or scattered (arrowhead)] do not express any pituitary hormone. **C)** GFRa2+ cells are epithelial cells with enhanced expression of Cytokeratins, E-cadherin and beta-Catenin. Coronal versus Axial sections demonstrates the orientation of the GFRa2 cells within the niche. In the coronal axis, GFRa2 or b-Catenin appear respectively as a thin line or a U-shaped green staining; in the axial axis GFRa2 appears as a broad surface while b-Catenin shows a ring shaped staining in a perpendicular orientation. **D)** Localization of GFRa2 cells and co-localization with E-cadherin and b-Catenin in mouse pituitaries.
doi:10.1371/journal.pone.0004815.g001

suspension culture in a serum-free conditioned medium (SpherM). 2500 cells either GFRa2+ or GFRa2–negative were seeded in a 35-cm-diameter dish (around 800 cells/ml). After seven days, while the GFRa–negative dishes presented a few clumps of cells (12 clumps/dish, 4–8 cells/clump), the GFRa2+ cells formed spheroid

structures either compact or hollow with an empty cavity surrounded by small cells (>139 spheroids/dish, around 40 cells/spheroid; average of more than 50 experiments). Some of the spheroids contain cilia and display active movements (Figure 4A and Videos S3, S4, S5 and S6). One of the roles of planar polarity in embryogenesis is to induce oriented cilia during morphogenetic migration, and functional defects in these cilia cause embryonic abnormalities [34]. In humans, GPS are located around the reminiscent Rathke's cleft (see Figure 3), which has been described to present cilia [35,36]. A benign non-neoplastic disease called Rathke's cleft cyst (RCC) is in fact characterized by a MZ cyst pathognomonically surrounded by ciliated cells [37]. These cysts are thought to originate from remnants of the Rathke's pouch and, in fact, their localization is similar to what shown in Figure 3 for human GPS cells.

The spheroids actively divide up-to 50 cells (Figure 4B). Opposite, the GFRa2 negative fraction maintained in parallel remains as isolate cells with a few 4–8 cell clumps and does not grow (BrdU-negative, Figure 4B, right, white bars). To demonstrate that the spheroids are clonal, i.e. originate from a single cell, we diluted the GFRa2+–cell suspension to 18 cells/ml and seeded 1 ml/well in the first column of a 24-well dish. Dilutions 1:2 were performed in the next columns up to 0.5 cells/well. After five days spheroids were carefully looked out and all of them photographed to count approximately the number of cells per spheroid (Figure S3-A, a representative experiment with quadruplicates is shown). All the spheroids found were multicellular (ranging from 25 to >100 cells/spheroid). The number of individual spheroids per well were proportional to the number of individual GPS cells seeded per well. Even diluting at 0,5 cell/ml we found near one multicellular spheroid per well.

The spheroids maintain GFRa2 expression and display positive labeling for Oct-4, Prop1, E-cadherin, and b-Catenin but are hormone-negative (Figure 4C–D and Fig S3-B). The GFRa2 ligand, Neurturin (50 ng/ml) has a trophic effect in the spheroid number when culturing in a diluted (0.5×) SpherM (Figure S3-C) indicating the GPS dependence of a functional RET/GFRa2/NTN pathway. If the pituitaries are dispersed with trypsin (instead of Collagenase) no single spheroid grows from the few GFRa2+ purified cells. This may be explained by possible deleterious effects of trypsin in the extracellular domain of GFRa2. Similarly, if the spheroids are dispersed with trypsin, they are able to make secondary spheroids albeit the number of secondary spheroids obtained was 1/3 of the number of GPSs seeded.

In the presence of gelatin and conditioned-media from MEFs (50% MEFM), these GFRa2/Prop+ cells attach to the well and grow slowly as a scattered culture (Figure S3-D). However, after the second passage, differentiated structures as “cord-like” structures, colonies expressing red pigmentation or other kind of defined-cells appear under the microscope intermingled with the scattered GFRa2+ cells. We don't know at present if the GPSs have multipotent capacity. When the GPS cells are cultured on top of mitomycin-treated MEFs in the presence of the characteristic medium for Stem cells (StemM), they grow as undifferentiated

Table 1. Markers expressed by GFRa2+ cells.

Marker	% of GFRa2+ cells containing the marker*
Hormones	
GH	0%
ACTH	0%
PRL	0%
TSH	0%
FSH	0%
LH	0%
Epithelial markers and Wnt pathway	
Multi-Cytokeratin	90%
E-cadherin	86%
b-Catenin	91%
GFRa2 pathway	
Ret	78%
GFRa1	0%
NTN	0%
Stem cell markers	
SSEA4	100%
Prop1	99%
Oct4	94%
Sox2	91%
Sox9	96%
Sox4	0%
Nestin	0%
Nanog	0%
Isl-1	0%
Pax6	0%
Other Markers	
S-100	43%
Vimentin	<3%
Proliferation markers	
Ki67 in adult GPS	0%
Ki67 at 10 days	13%

*Percentages are calculated counting cells from (confocal) microscopy pictures (magnification higher than 400×). For each combination of markers, between 125 and 200 cells were counted from at least three independent pituitaries.
doi:10.1371/journal.pone.0004815.t001

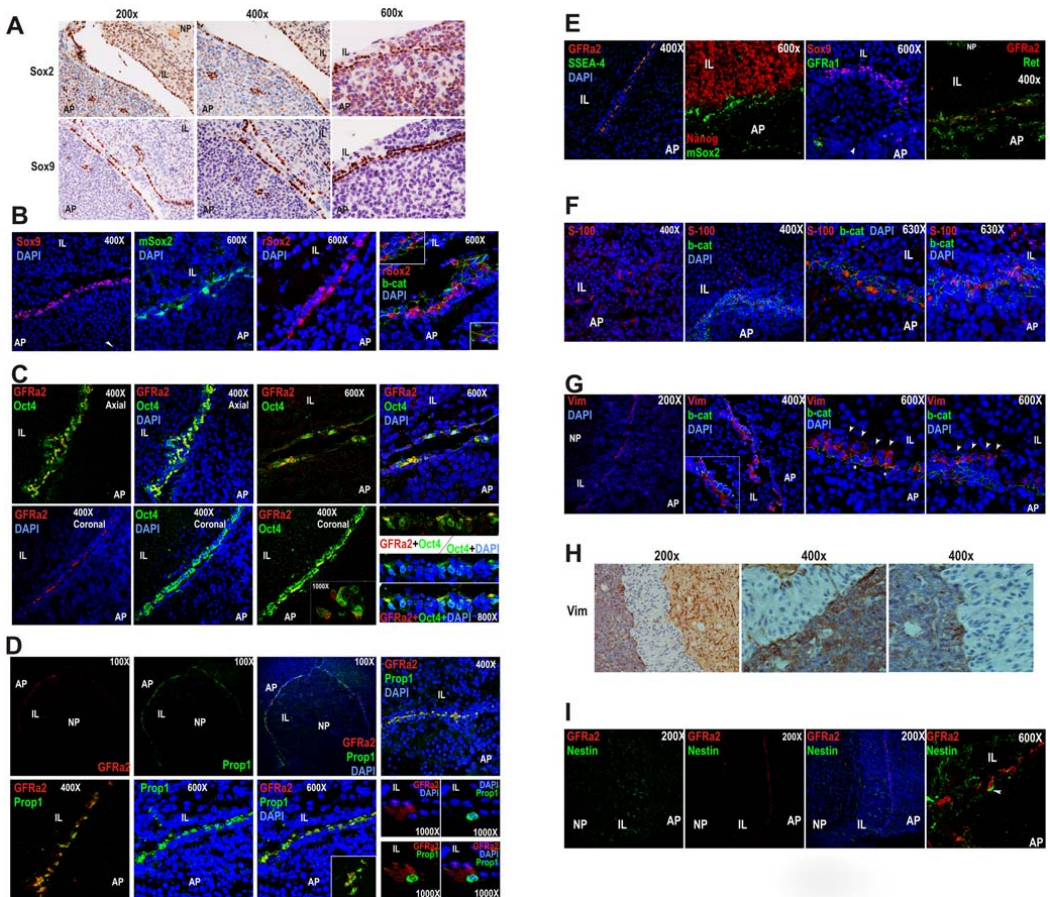


Figure 2. The GPS Niche: GFRA2 cells express Prop1 and stem cell markers while neighbor cells express Vimentin. A) Detection of Sox2 and Sox9 in the mouse and the rat pituitary (mSox2: mouse monoclonal and rSox2: rabbit polyclonal anti-Sox2 antibodies). **(B).** Sox2 signal co-localizes with b-Catenin. **(C)** In rat pituitary, Oct4 is also expressed in the same line of cells, and co-localizes with GFRA2. **(D)** Co-localization between GFRA2+ and Prop1 in the marginal zone between the AP and IL. Notice the nuclei positive for Prop1 surrounded by the GFRA2 membrane staining. **(E)** GFRA2 cells co-localize with SSEA4, a glycolipid characteristic of Stem cells, but not with Nanog, which is restricted to the IL. GFRA2 cells do not express GFRA1 (which is however observed in somatotrophs) but weakly express the Ret receptor (Fig. S2). **(F)** S-100 is expressed by the folliculostellate cells of the IL and AP of rat pituitary, but is also concentrated in around half of the b-Catenin/GFRA2 cells. **(G)** Vimentin, a mesenchymal stem cell marker, is also expressed in the same niche as the GFRA2 cells but not in the same cells. Towards the IL, a parallel line of elongated cells (arrows) just beyond the b-Catenin/GFRA2 cells (asterisks) can be observed; fixation provokes sometimes the separation of both lines of cells (right panel). A similar Vimentin staining is seen in mouse pituitary **(H).** **(I)** Although Nestin is expressed in the three portions of the pituitary, GFRA2 cells are negative for Nestin expression. Thin structures similar to axons apparently coming from the Nestin+ neuropituitary contact the GFRA2 cells (arrowhead).
doi:10.1371/journal.pone.0004815.g002

colonies and display cilia (Figure S3-C and Video S7). In the presence of MEFM supplemented with LIF (ESGRO), these cells do not attach to the gelatin-coated dish but grow as floating spheres. We have been able to maintain these cultured GPS cells either as attached/floating colonies or spheres at least up to the 7th passage and still continue (Figure S3-E).

We next asked whether GFRA2+ spheroids maintain the capability to differentiate to endocrine cells. Single spheroids were isolated by pipetting under the phase-contrast microscope and placed on Collagen Type IV coated wells, the collagen

characteristic of basal membranes from epithelial layers. We next induced attachment with serum for one day, followed by incubation in medium containing a specific combination of supplements (DifM 1–4, see Methods). The spheroid got attached during the first 24 hours of culture in presence of serum. From that moment on, the cells start to attach to the dish and the spheroid progressively disappears. Some of the cells migrate very far away from the point where the spheroid attaches. If the spheroid was big many cells appear on the dish; if the spheroid was small less reduced numbers appear. That means that although we

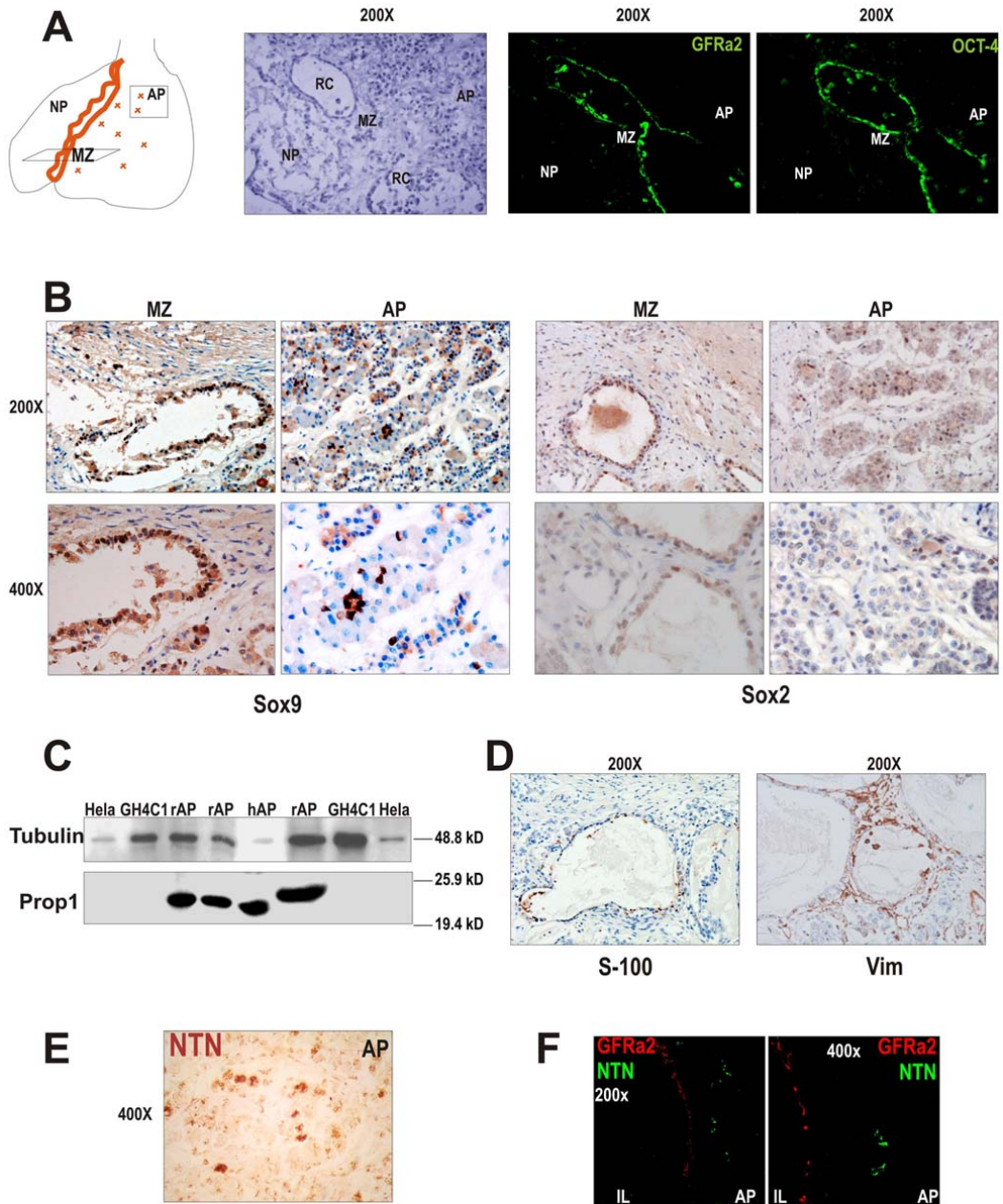


Figure 3. The human marginal zone (MZ) of the pituitary contains a similar niche of GPS cells. **A**) Cartoon representing the anatomy of the human pituitary with the anterior AP and a posterior NP; the boundary is called MZ and contains dilated structures usually called Rathke's remnant's Cysts (RC). Cells lining the RC express GFRa2 and Oct4. **B**) These cells also express Sox9 and Sox2. The human pituitary also contains small groups of Sox9+ or Sox2+ cells within the AP. **C**) Western blot detection of the pituitary specific factor Prop1 protein in rat (rAP) and human (hAP) pituitary, but not expressed in HeLa cells or a somatotroph pituitary cell line (GH4C1). **D**) S-100 is expressed in around half of the human GFRa2 cells lining the RC, similarly to what observed in the rat pituitary. Similarly, Vimentin+ elongated cells surrounded the GFRa2 epithelium (right panel). **E**) The GFRa2 ligand NTN is expressed in the human and rat **F**) pituitary, and localizes exclusively at the AP. doi:10.1371/journal.pone.0004815.g003

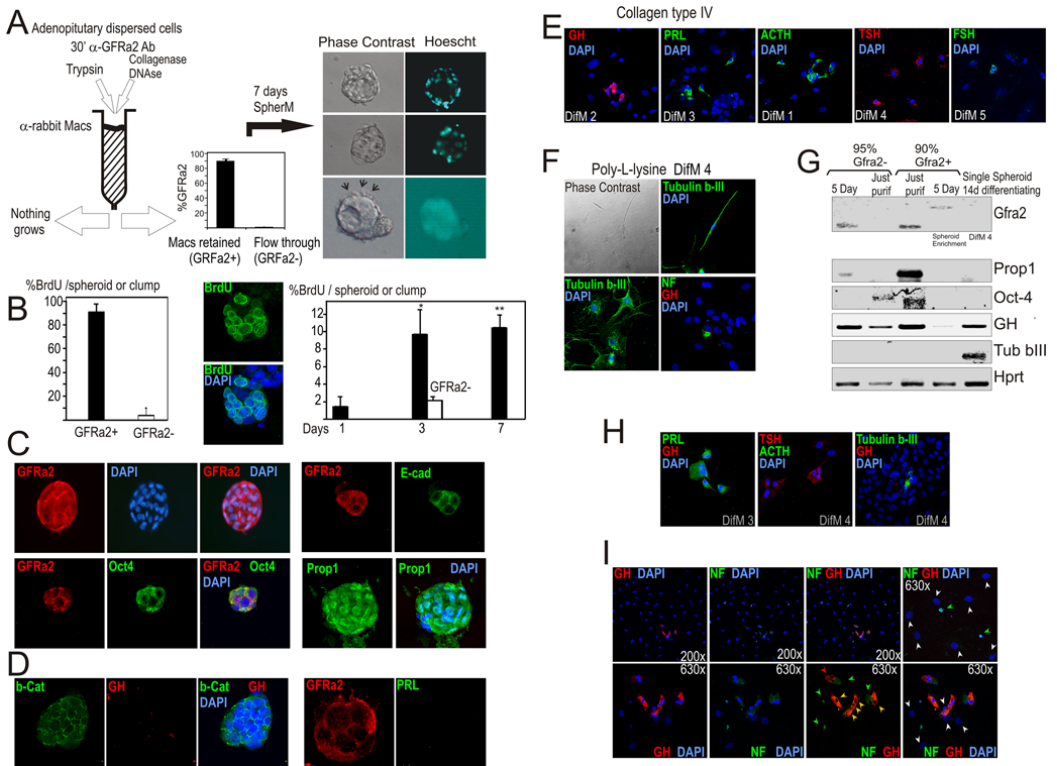


Figure 4. Purified GFRa2+ cells form embryonic-like spheroids that differentiate into different ectodermic cell types. **A)** Rat AP single-cell dispersions are prepared by treatment with Collagenase. The two fractions obtained, a GFRa2+ (95% positivity for GFRa2 by immunofluorescence) and the Flow through GFRa2- (95% negativity for GFRa2), are then kept in SpherM. After 7 days, spheroids formed by small cells are observed in the GFRa2+ fraction. Some of them contain a hollow cavity while others are compact. A bunch of moving cilia is frequently observed in one pole of these spheroids (arrows; see videos in Supplementary Information). AP cell dispersion with trypsin does not result in viable spheroids as GFRa are extracellular receptors sensitive to trypsin treatment. **B)** Proliferation in the GFRa2+ and GFRa2- fractions after 5 days in the presence of BrdU. Center: A 7-day-old spheroid incubated with BrdU only for the last 12 hours before fixation. Right: BrdU uptake within growing spheroids incubated with BrdU during the last 12 hours before fixation. **C)** The spheroids are clonal (see Figure S3-A) and express GFRa2, Oct4, Prop1 or E-cadherin. **D)** These structures express b-Catenin but not hormones such as GH, PRL (and S3-B) or ACTH (data not shown). **E-I)** A single spheroid was transferred under the microscope to a collagen/poly-lysine-coated well and attached to the matrix with serum for 24 h. Spheroid structure disappear and cells spread through the well. Cells differentiate depending on the culture conditions into **E)** different pituitary secretory types (intermediate nuclei) or **F)** neurons (small or big nuclei) showing Tubulin beta III+ cells+ or NF+ cells. **G)** mRNA expression of GFRa2/Prop1/Oct4 in the GFRa2+ purified fraction. The GFRa2+ fraction still have some contaminating secretory cells expressing GH. Five days later (spheroids) RNA expression of GFRa2 shifted (alternative splicing) while Prop/Oct4 were negative (even if the proteins were present). 14 days after differentiation of a single hand-picked spheroid, expression of either secretory (GH) or neuronal (Tubulin b-III) differentiation markers is detected. **H)** Double immunofluorescence in differentiated spheroids showed that differentiation is most frequently driven towards either secretory or neural phenotype. **I)** However, in some wells double GH/NF+ cells (orange arrows) together with single GH+ (red arrows) or NF+ (green arrows) or negative (white arrows) cells coexisted (Table 2).

doi:10.1371/journal.pone.0004815.g004

cannot exclude the possibility of proliferation after the induction of attachment/differentiation we have the repeated impression from the many experiments that the differentiated cells do not proliferate. Using this approach, we were able to differentiate these spheroids into GH-, PRL-, TSH-, ACTH-, or FSH-producing cells (Figure 4E). We did not observed any cell positive for GFRa2 or Prop1 after differentiation (Table 2). When spheroids are seeded on top of Poly-L-lysine with DiM4, Tubulin-beta-III positive cells are observed. Tubulin-beta III is characteristic of neurons and in fact some of these cells present bipolar appearance (Figure 4F), suggesting an ectodermal stem cell

potential for pituitary GRFa2+ cells. Similar results were obtained using the characteristic neuronal intermediate filament protein Neurofilament (NF).

To evaluate RNA expression throughout the differentiation process, we performed RT-PCR analysis in the GFRa2+ fraction (90% pure), the GFRa2-negative fraction (95% pure), in both fractions 5 days after culture in SpherM (when there is a spheroid-enrichment in the GFRa2+ fraction), and in the cells obtained after differentiation of a single spheroid in DiM4 (Figure 4G). GPS stem markers are strongly expressed in the GFRa2+ fraction and absent in GFRa2-negative cells. In parallel, GH expression is

Table 2. Summary of all the differentiation experiments with the 5 differentiation media (DifM1-5)*.

	GH		PRL		bTSH		ACTH		bFSH		Tub b III		NeuroF	
	n ⁺	nuclei	n ⁺	nuclei	n ⁺	nuclei	n ⁺	nuclei	n ⁺	nuclei	n ⁺	nuclei	n ⁺	nuclei
DifM1	n.t.		n.t.		0	10					n.t.		n.t.	
							9	38						
							10	18						
DifM2	1(1)	25							5 (1)	25	n.t.		n.t.	
	1(1)	52					12(1)	52						
			0	17										
			0	17										
					6 (0)	29	0 (0)	29						
					7 (0)	9	0 (0)	9						
	8(0)	27							0 (0)	27				
	3(2)	58							2 (2)	58				
DifM3	0 (0)	17	6 (0)	17			n.t.		n.t.		n.t.		n.t.	
					0	15								
			6(a)	51										
	<u>0 (b)</u>	18												
			<u>2(a)</u>	3										
	0	13												
DifM4 (Polylysine)							n.t.		n.t.		5	15		
					26(0)	27					1(0)	27		
					7 (0)	28					0 (0)	28		
	6(5)	93											10(5)	93
	3 (0)	9											0 (0)	9
	7 (0)	37								0 (0)	37			
	0 (0)	117								2 (0)	117			
	0 (0)	50											1 (0)	50
	0 (0)	25								24 (0)	25			
			0	18										
DifM5	n.t.		n.t.		n.t.		n.t.		2	31	n.t.		n.t.	

* A single isolated spheroid was induced to attach to the gelatine-coated (DifM1,2,3 and 5) or polylysine-coated (DifM4) well with serum for one day, and induced to differentiate during 15 days in the presence of any of the DifM 1 to 5. Wells were fixed and immunofluorescence performed. In some wells double immunofluorescence was performed (aligned in the same row): those wells where more than one cell type co-existed are written in bold and the number of cells double positives for both markers is shown in brackets; those wells where one single type of cell was detected are in italics. In some of the wells (underlined), co-immunofluorescence for GFRa2 (a) or Prop (b) was performed, always with a negative result.

doi:10.1371/journal.pone.0004815.t002

still present after purification, probably due to the abundance of somatotrophs in the pituitary (10% contaminating GFRa2-cells). After culturing in SpherM medium, expression of GPS markers decay although the proteins are still present in the spheroids, and GFRa2 band shifts to a different spliced band. No differentiation markers, Tubulin-beta III, or a very weak band of GH can be detected. It seems that the GPS cells in the spheroid structures start to change its characteristics but need later inputs from different ligands (present in the various DifM) to get differentiated; some of these differences are downregulation of Oct4, Prop1 mRNA expression or alternative splicing of GFRa2 mRNA. In the GFRa2- fraction (95% GFRa2-) with days positivity for GFRa2 and Prop1 mRNA appear demonstrating the self-renewal capacity of the few remaining GFRa2+ cells.

When the spheroids are induced to differentiate, no GPS markers are detected but GH and Tubulin-beta III are expressed de novo. In our hands, differentiation protocols are quite specific since lactotrophs (PRL) are only obtained with DifM 3, whereas

GH was never detected in this medium (Table 2). When two markers were simultaneously analyzed in the same well, the majority of differentiated cells are positive for one marker and there was only one type of differentiated cell (blue on Table 2, Figure 4F and H-left). However on occasion two types of differentiated cells co-existed on the same well (green on Table 2, Figure 4I, lower magnification), and even there were some cells positive for two hormones or for GH and NF (pink on Table 2, Figure 4I, higher magnification). In general, positivity for hormones is linked to a nucleus of intermediate size; positivity for NF correlates with a nucleus of small size; and positivity for Tubulin-beta III is frequently observed in cell with a large nucleus.

Slow proliferation and long telomeres in the GPS niche of adult animals

In vivo the stem cells are slow cycling cells that retain the nuclear DNA label of infancy into adult age as demonstrated for mouse skin, mammary gland, endometrium and liver [38–41], or

for rat pancreas and kidney [42,43]. The GPS niche already exists in newborn-rat pituitaries (Figure 5A). GRFa2+ cells actively divide during early postnatal development but loose proliferative potential with age, as detected by Ki67 staining of the GPS niche (Figure 5A and B). Also in adult mouse pituitaries, cell division is scarce and rarely observed in GPS cells (Figure 5C), thus suggesting that GPSs were slow cycling cells *in vivo*. In parallel, the expression levels of stem cell markers in the AP decrease during postnatal development to adulthood in an inverse correlation with the production of hormones or the Pit1 transcription factor (Figure 5D), implying a division of stem cells to increase pituitary mass. To analyze the frequency of replication in the putative stem cell niche, we used the BrdU retaining technique. In rats, GRFa2+ cells specifically retained BrdU even 60 days after an injection when newborns whereas this signal was lost in most of the other cells in the pituitary (Figure 5E). These results suggest that the niche of GRFa2 cells replicates slowly after birth, a property shared by most progenitor/stem cells.

Slow replication is linked to long telomeres and these two features are a hallmark of stemness [44–46]. Mature cells have usually undergone many divisions and telomere length gradually decreases with each cell cycle due to incomplete replication of telomeric DNA. We have used a novel technique, “telomapping”, to quantify the length of telomeres *in situ* based upon the specific *in-situ* hybridization of a fluorescent telomeric DNA probe on paraffin sections. The longest telomeres in the pituitary specifically mark the marginal zone within the IL/AP boundary where GPS cells are located (Figure 5G). Progressive rows of cells towards the AP or NP present less intense signals (orange) while the mature secretory cells in AP have the faintest signal (green) corresponding to short telomeres. These results suggest that progenitor cells in the pituitary are located to the MZ where GPS localize. On the other hand, most cells in the AP display short telomeres suggesting an abundant component of mature cells that have undergone many cell divisions.

Altered cell cycle regulation of GPS cells in genetically-modified mouse models with hypo- or hyperplastic pituitaries

Proliferation in the progenitor/stem cell niches depends on Cdk4 activity, being carefully downregulated within the niche and increasing when the progenitor cell enters in the so-called transit-amplifying state to become differentiated [47]. Cdk4-deficient mice in which Cdk4 has been inactivated by the insertion of a neomycin-resistant (neo) cassette [Cdk4(n/n) mice] [48] display hypoplastic pituitaries with a dramatic decrease of all hormone-secretory cells in the AP during postnatal life (Figure 6A–B, center and Figure S4). These Cdk4-null pituitaries display normal Ki67 staining during embryonic development but a decreased proliferation after birth (data not shown), similarly to that we have previously observed in Cdk4-null endocrine cells in the pancreas [49]. Yet, the ratio between GPS cells and total number of cells in the pituitary was not only maintained but enlarged in these animals suggesting normal production of these cells during embryonic development but abnormal differentiation into hormone-producing cells. Thus, whereas wild-type mice contain about 0.9% of GPS cells (see Figure S1), these cells display a relative 3-fold enrichment in Cdk4(n/n) mice (Figure 6C). Moreover Cdk4-null pituitaries display long telomeres throughout the AP (Figure 6D), suggesting a reduced number of cell cycles in these small anterior pituitaries. Hypoplastic Cdk4 KO pituitaries do not exhibit an enriched “niche” in absolute terms. The niche is relatively enriched considering the reduced number of endocrine-producing cells. The interpretation is in keeping with the concept

that most defects in stem cell proliferation result in a defect in differentiated cells without affecting the stem compartment. A similar situation has been found previously in the hematopoietic compartment of Cdk4/6 deficient embryos [50].

Interestingly, these three phenotypes (reduced pituitary size and cellularity, relative increase in GPS cells and long telomeres in the AP) are rescued when Cdk4 is re-expressed [Cdk4(R/R) mice] by expressing Cre recombinase and removing the neo cassette (Figure 6A–D, right panels), in parallel with the recovery of normal pituitary function (Figure S4). These results suggest that Cdk4 participates in the control of postnatal proliferation and/or differentiation of GPS cells.

Discussion

The existence of a primordial cell in the pituitary was proposed more than ten years ago when exceptional human pituitary adenomas were observed to concomitantly express Pit1-dependent hormones (GH, PRL and TSH) plus ACTH and gonadotrophic hormones [51–53]. More recently, the presence of stem cells in the pituitary has been suggested in dispersed cultures isolated by cytometry as a Side Population (SP cells) of mouse pituitary cells positive for Sca1, Nestin, Nanog and Oct4, but negative for Prop1 [7]. Additional progenitor cells have been also proposed as a colony-forming population of Sca1+ and angiotensin-converting enzyme (ACE)-+ cells [9]. Some of the later were in fact located to the MZ of the pituitary. The MZ had been proposed to harbor stem/progenitor cells originated from the Rathke’s pouch from which the endocrine cells could be produced [1,9]. Recently, Sox2+/Sox9– cells have been found in the mouse MZ but also strongly dispersed throughout the pituitary intermingled with secretory cells [10]. A population of Nestin+ cells has been traced after birth in the pituitary *in vivo* [11]. Nestin+ cells were found in the three parts of the pituitary, and only a small population of the adult secretory AP cells was originated from these Nestin+ cells postpuberally, more than 2.5 months after birth. At present, it is unclear whether the growth of the pituitary after birth or maintenance of the adult population of secretory cells requires a single or several types of progenitor/stem cells.

We have characterized a specific cell population in the MZ of the rodent –rat and mice– and human pituitary, initially identified by the expression of the GRFa2 receptor. These cells exhibit unique features, *i.e.* not present in other pituitary cell-types, such as the presence of GRFa2 receptors, the expression of the pituitary specific transcription factor Prop1, and the presence of additional stem cell markers such as Sox2, Sox9, SSEA4 and Oct4. The presence of these markers, long telomeres, and the *in vitro* potential of GPS cells to differentiate in all AP endocrine cells make them strong candidates for the maintenance of differentiated cells on the pituitary. GPS cells are Nanog/Nestin-negative but similar Oct4+ Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPCs) have been reported to be negative for other embryonic stem cell markers such as Nanog or Sca1 [54]. SSEA-4 is an embryonic stem cell marker in humans but it is not present in mouse embryonic stem cell lines, which are instead positive for SSEA-1. There is not known in much detail what markers are present on the surface cells of the early rat embryo stages, if they would be lacto-series of glycolipids (SSEA-1) as in mouse or globo-series of glycolipids (SSEA-3 and SSEA-4) as in humans. Rat embryonic stem cells recently obtained expressed SSEA-4, SSEA-3 and SSEA-1 on top of Oct4 or Nanog [55]. In agreement with these results, it was known that a small percentage of rat Dorsal Root Ganglia (DRG) “small” precursors were positive for SSEA-4 [56]. The DRG is one of the niches where neural crest progenitors/stem

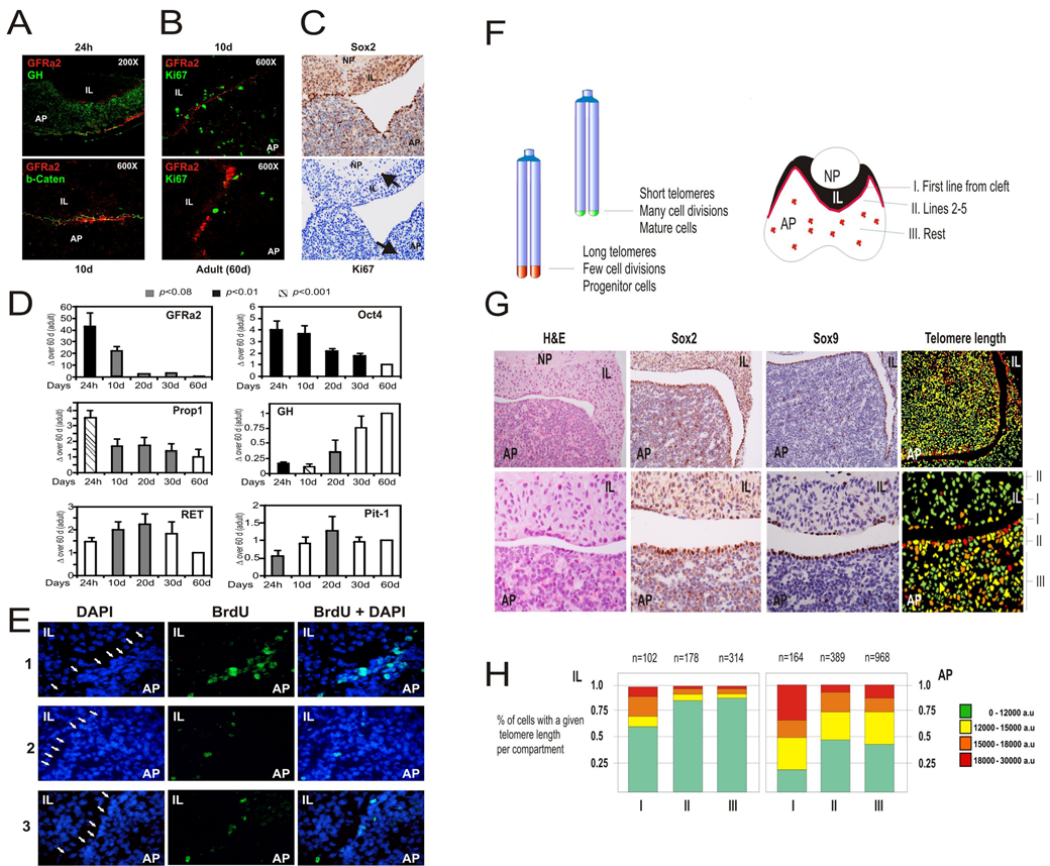


Figure 5. GFRa2+ niche is present at birth and maintained through adulthood with reduced proliferation and long telomeres. A) Newborn (24 h) and 10-days (10 d) old rat pituitaries present a GFRa2+/b-Catenin+ but GH- niche similar to that adult pituitaries (60 to 90-days old). **B)** 10 d pituitaries display abundant cell proliferation in the GPS niche, as seen by Ki67 staining, opposite to the adult rat (60 d) or mouse organs. **C)** Expression of GFRa2, Oct4, Prop1, GH, Ret and Pit1 in the AP of newborn and 10-, 20-, 30- and 60-day-old rats as detected by qRT-PCR. GPS progenitor markers (GFRa2, Oct4, Prop1) decrease with age while somatotroph markers (Ret, Pit-1) peak around puberty, day 10 to 20, or increase with growth to adulthood (GH). **E)** BrdU retaining in the GPS niche (arrows). Adult-pituitary nuclei within the niche retain BrdU injected in the rats as newborns. Three different animals (1–3) are depicted in the figure. **F)** Telomapping analysis of normal mouse pituitaries demonstrates a thin line of very long-telomere containing nuclei exactly in the first row of cells at the IL/AP boundary (regions I) matching the GPS niche. The following rows of cells towards the AP or the IL/NP present a shortening of the telomeres while the bulk of secretory cells have short telomeres characteristic of differentiated cells. **G)** Normal pituitaries were stained with H&E, Sox2 or Sox9 showing the GPS cells in the AP/IL boundaries (AP region I and IL region I) and some scattered groups through the AP (mostly in region III of the AP). Telomapping analysis as quantified in **H)** indicates that the region I of AP contains most long-telomere cells. This percentage progressively decreases in region II and III, where scattered GPS cells with long telomeres are found. In the IL, the only cells with long telomeres are also located in region I of the IL. AP, adenopituitary; IL, intermediate lobe; NP, neuropituitary.
doi:10.1371/journal.pone.0004815.g005

cells reside ([57] and many previous references therein). The mouse vs. human difference present into embryonic stem cells, changes in adult stem cells. Recently, it has been demonstrated that hematopoietic stem cells are positive for SSEA-4 (and Sca1 positive but c-Kit/CD45/Flk-1 and SSEA-1 negative) both in mouse and in human and, in fact, SSEA-4 has been proposed to better purify HSCs from the bone marrow [58].

Adult stem cells divide infrequently and reside in protected microenvironments or niches [59] with a low rate of telomere

erosion throughout their life-time. These niches can be either acellular or contain other cell types that give support to the stem cell niche [60]. The presence of Vimentin+ cells near the GPS cells in both rodent and human pituitary suggests the presence of a cellular stem cell niche on the pituitary. GPS cells also express E-cadherin and b-Catenin in a polarized manner (coronal vs. axial) surrounded by Vimentin+ cells, suggesting a putative relation with the known function of the Wnt/b-Catenin pathway together with E-cadherin to retain the stem cells within the niche confines [60]. Future studies

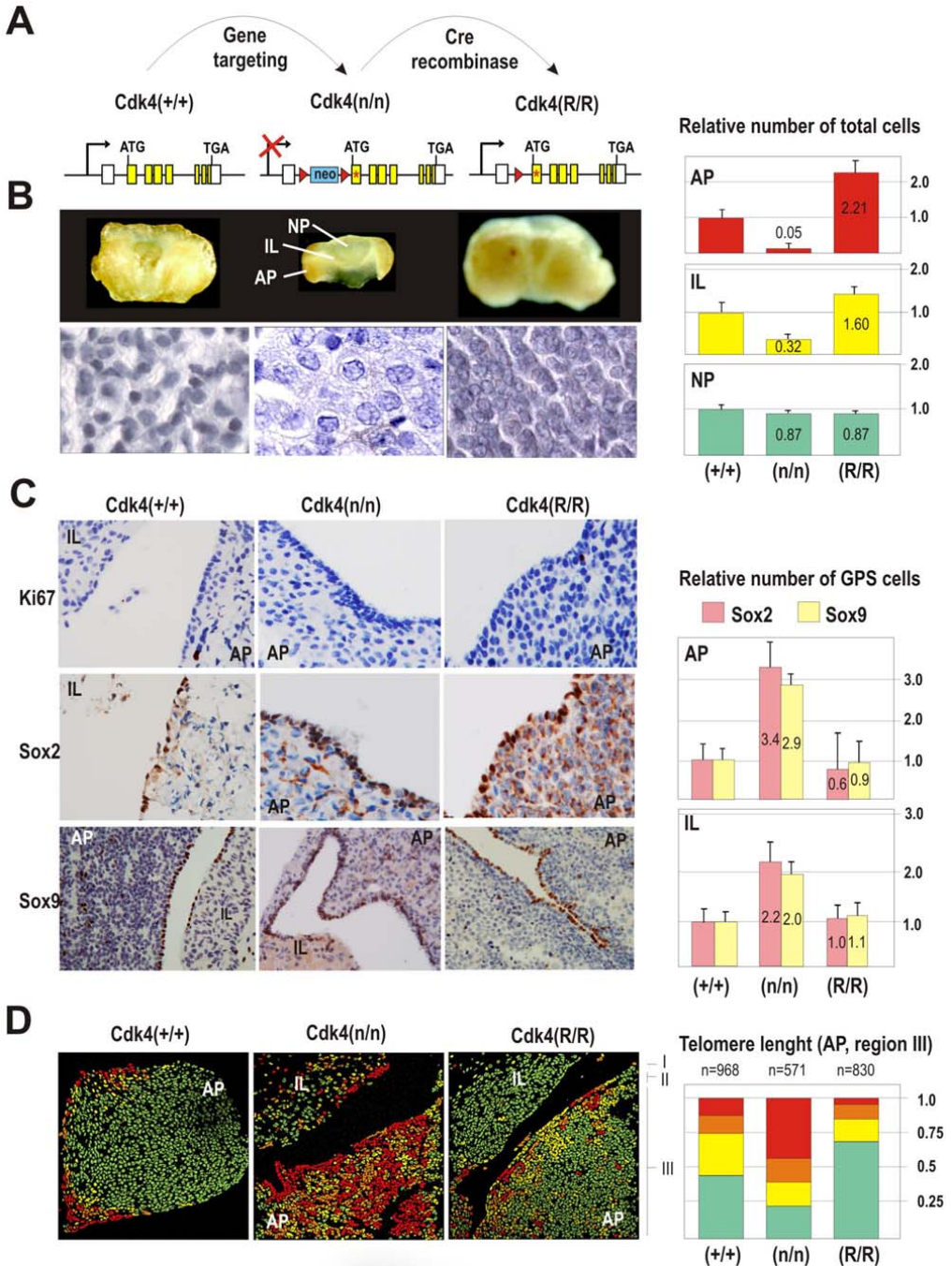


Figure 6. Increased relative abundance of GPS progenitors and decreased formation of endocrine cells in *Cdk4*-null mice. **A)** Alleles used in the analysis of GPS cells in a hypopituitarism model. The *Cdk4*-null allele *Cdk4*(n) is obtained by insertion of a neo-resistance cassette in *Cdk4* intron 1. This mutation is rescued by expressing, through Cre recombination, a *Cdk4*^{R24C} mutant allele that encodes a hyperactive *Cdk4* [48]. **B)** *Cdk4*-null mice display a hypoplastic pituitary much smaller than the wild type due to low cellularity and smaller size. These differences mostly affect the AP, containing around 5% cells of the wild-type pituitaries by 2-month age. This phenotype is rescued in the *Cdk4*(R/R) which displays a bigger pituitary with a 2-fold increase in the AP by 2-months. **C)** Genetic ablation of *Cdk4* does not affect the structure of the stem cell niche. Moreover, the relative abundance of GPS cells is enlarged presenting more cell layers and 3–3.5-fold more GPS cells in the AP and 2-fold in the IL. **D)** The overall length of telomeres is significantly increased in the *Cdk4*-deficient AP distal region III. About 48% of these cells display long telomeres whereas this number is about 12% in wild-type or *Cdk4*^{R24C}-rescued AP. AP, adenopituitary; IL, intermediate lobe; NP, neuropituitary.
doi:10.1371/journal.pone.0004815.g006

assessing a role of the canonical Wnt pathway on this niche are clearly merited. Perpendicular staining of *GFRa2* versus *b-Catenin* within the GPS niche reminds of planar polarity, a specific coordination of an epithelial layer of cells to behave with a physiological direction (recently reviewed in [27,61]). It is therefore not casual that isolated GPS cells in culture form moving embryonic-like spheroids and present specialized cilia. One of the roles of planar polarity in embryogenesis is indeed to induce oriented cilia during morphogenetic migration to prevent embryonic abnormalities [34]. The planar polarity in the GPS niche also suggests a functional asymmetric signaling in which both the *GFRa2* and Wnt pathways may be implicated. Thus, the *Ret/GFRa2* pathway may help to indicate the cells in the niche the correct side to migrate and/or to proliferate. The expression of the ligand *NTN* in discrete cells through the AP but not in the niche cells adds an interesting suggestion of luring the GPS cells out of the niche through a guiding gradient. This situation is reminiscent of the niche present in the seminiferous tubules of the testes where *Ret* and *GFRa1/GFRa2*, along their ligands *GDNF* and *NTN*, play an important role in the interplay between multipotency versus differentiation of the germ stem cells [18,19,62]. Similarly, in the pituitary, the *NTN/GFRa2* axis may modulate stem/progenitor physiology whereas *Ret/GFRa1* system controls somatotroph differentiation and fate (death versus survival) through *Pit1* regulation as we have described previously [63].

Some additional genes expressed by the GPS niche, such as *Sox* proteins or *Prop1*, have important roles in pituitary physiology and disease. Mutations in the *Sox2* gene cause pituitary hypoplasia associated with hypogonadotrophic hypogonadism and eye, ear and encephalic abnormalities [64–67]. Ames dwarf mice and *Prop1* null mice have a normal pituitary volume at birth but the organ does not grow nor differentiate in postnatal life. Similar phenotype have the patients affected by Combined Pituitary Hormone Deficiency (CPHD) [23], a hypopituitarism caused by mutations in *Prop1* [68] where there pituitary undergo progressive hormone loss suggesting a depletion of progenitors. Patients with CPHD display a general loss in all types of secretory cells, but affecting more those that are required throughout growth and puberty (GH, LH/FSH) and metabolism (TSH). Although initially it may be not present, delayed ACTH deficiency also appears [69]. Some patients present with hyperplasia of the pituitary while others display hypoplastic pituitaries; moreover, it is currently accepted that enlargement of the pituitary precedes the hypoplasia [69,70]. Ames dwarf mice have a slightly different phenotype, with the predominant failure in the *Pit1*-dependent secretory types (GH, PRL, TSH) and apparently not deficiency in gonadotrophs/corticotrophs [22,71]. Since this is a spontaneous mutation we cannot be sure of the genetic background. However, *Prop1*-deficient mice have display a phenotype similar to the human CPHD, including gonadotroph deficiency [25]. Both Ames dwarf and *Prop1*-deficient mice have a normal (or only slightly decreased) pituitary at birth, suggesting a defect in adult homeostasis. Moreover, *Prop1* transgenic mice have a delay in puberty [72]. *Prop1* in the pituitary embryonic progenitor cells of the Rathke's pouch is considered to play a role in the

migration process of the progenitor cells out of the marginal zone [26,73]. Our data demonstrate that *Prop1* expression in the adult pituitary is restricted to the GPS niche. It is tempting to speculate a role for *Prop1* in protecting the stem cells and correctly guide them through asymmetric division/differentiation when needed. A detailed study of the niche in these animal models will be performed.

Interestingly, the pituitary deficiency induced by *Prop1* mutations is reminiscent of the hypopituitarism induced by inactivation of the cell cycle regulator *Cdk4* ([74] and Figures 6 and S4). GPS cells are present in this model although accompanied by an overall decrease in endocrine producing cells. These AP cells display longer telomeres suggesting a defective number of cell divisions from their progenitor cells. Interestingly, *GFRa2*-deficient mice display a significant failure to thrive after weaning although the involvement of pituitary function in this phenotype has not been addressed [16]. Also similarly to *Cdk4*, persistent *Prop1* expression in the mouse delays endocrine differentiation and enhances tumor susceptibility [72] (see below).

The initial Rathke's pouch, as well as the encephalic neural tube, comes from the anterior ectoderm. *GFRa2+* spheroids are able to differentiate to secretory pituitary cells but also towards neuron-like phenotypes when driven appropriately with a specific differentiation medium. A similar induction of neuronal phenotypes from epithelial stem cells of the inner ear has been demonstrated ([75]). Similarly, pituitary secretory cells can be obtained from neuronal fetal progenitors [76] and many human pituitary adenomas present with neural metaplasia [77]. However, the GPS are able to remain undifferentiated when grown in conditioned-medium from MEFs; in this conditions, however, part of the cells differentiate spontaneously with passages. GPS remain undifferentiated and form colonies when grown directly on top of MEFs or when grown in the presence of *ESGRO* (*LIF*), a feature shared by all stem cells described.

All together, our results suggest that GPS cells may have relevant contributions to postnatal pituitary homeostasis. These cells a likely to form a functional niche of adult precursor cells with functional relevance in the physiological expansion of the pituitary gland throughout life as well as protection from pituitary disease.

Materials and Methods

For a detailed list of methods and antibodies and dilutions see Supplementary Methods S1 and Table S1, S2 and S3.

Human and murine samples

Rats were obtained from the Central Animal House of the USC, a registered animal facility that maintains the animals under welfare and ethical conditions complying with the 86/609/CEE, RD223/88, and OM 13/10/89 laws. The project had the approval of the Ethical Committee of the USC. Rat pituitaries were obtained from adult (200–250 gr., 60 days) male/female Sprague-Dowley rats. To study expression during postnatal development newborns, 10, 20, 30 and 60 days old male rat pituitaries were compared.

Human pituitary samples were selected from the archives of the Department of Pathology, Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, Spain). Informed consent was required from patients according to the policies of the Ethical Committee of the Hospital.

Generation and characteristics of the Cdk4-deficient mice has been previously described [48,78–80]. The Cre strain used was CMV-Cre [48]. Mice were maintained in a mixed 129/Sv×C57BL/6J background following the institutional guidelines at the Spanish National Cancer Research Center (CNIO) and the protocol approved by the Committee of Bioethics and Animal Care of the Comunidad de Madrid. The animals were observed in a daily basis and sick mice were euthanized humanely in accordance with the Guidelines for Humane End Points for Animals used in biomedical research.

Immunodetection

For immunofluorescence, rat pituitaries were oriented and immersed in an OCT-filled plastic cryomold (Sakura) and frozen inside a glass beaker filled with isopentane previously immersed in liquid N₂; frozen cryomolds were maintained at -80°C until sectioned in 10 microns cryosections. The sections were fixed with 0.1% Paraformaldehyde for 10 minutes (GFRA2, Prop-1, Oct-4, Cytokeratins, E-cadherin, SSEA-4, rabbit Sox2, Nanog, Nestin, ACTH, PRL, FSH, LH) or with -20°C methanol for 5 minutes (GFRA2, Prop-1, Oct-4, b-Catenin, rabbit anti-Sox2 (rSox2), Nanog, Ret, GFRA1, GH, TSH) or 0.5% paraformaldehyde for 20 minutes (GFRA2, GH, Ki-67); for mouse anti-Sox2 (mSox2) and Sox9 the pituitaries were fixed in 4% paraformaldehyde overnight before freezing and sectioning. Alternatively, cryosections were fixed in 4% paraformaldehyde for at least 10 minutes. Primary antibodies were applied overnight in PBS, thoroughly washed in PBS followed by 1 hour incubation with secondary antibodies, washing and mounted using GelMount (Biomedica). Guinea pig polyclonal antibody anti-Prop1 was made in house against the carboxy-terminal domain of mouse Prop-1. cDNA encoding amino acids 151 to 223 were cloned downstream of either a GST or a His-tag vector. Fusion proteins were expressed in BL21 E. coli and partially purified over glutathione agarose (Sigma) or Ni²⁺-NTA-agarose (Qiagen). Initial immunizations were performed with GST-Prop-1 fusion protein and the final boosts were performed with the His-Prop-1 fusion proteins. It has been already demonstrated that this antibody recognizes Prop1 transcription factor in mouse E12.5 [81]. Double immunofluorescences were performed in consecutive days; to prevent secondary antibody backgrounds, the order was dependent on the species of the primary antibody: first day goat, guinea pig or rabbit, second day rabbit or mouse respectively. Negative (using PBS instead of primary antibody) and preadsorption (competing with cold peptide/protein) controls were routinely run in parallel (see Supplementary Methods S1). Nuclei were counterstained with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI (Sigma). A TCS-SP2-DMRE Confocal Microscope with Ar, He/Ne 543 and He/Ne 633 Lasers (Leica) and LCS software was used to analyze the results.

For immunocytochemistry and telomapping, mouse or human pituitaries were fixed in 10% buffered formalin at 4°C , dehydrated through graded alcohols and xylene, and embedded in paraffin. Prior to embedding, pituitaries were oriented in order to obtain specific sagittal or coronal 5 μm sections. Prior to IHC, paraffin-embedded slides were de-paraffinized, re-hydrated, immersed in 10 mM citrate solution and epitopes retrieved by three high-power, 5 min microwave pulses. Slides were washed in water, blocked in 1:10 dilution of normal goat serum (Vector Labs) and incubated with primary antibodies. Slides were then incubated with secondary biotinylated antibodies followed by signal devel-

opment with an immunoperoxidase reagent (ABC-HRP, Vector Labs) and DAB (Sigma). Sections were lightly counterstained with hematoxylin and analyzed by light microscopy.

For immunoblotting, tissues or cells were lysed as previously described [63,82].

Isolation and culture of GFRA2+ cells

A detailed protocol is provided as Supplementary Information. Briefly, freshly isolated cell suspensions were prepared from male rat or mouse pituitaries using magnetic activated cell sorting (MACS; Miltenyi) or a fluorescence-activated cell sorter (FACS; FACSaria, Becton-Dickinson). The experiments with spheroids shown in the Figures 4 and S3 were performed with rat cells, although many have been reproduced in mouse cells (data not shown).

GFRA2+ purified cells were cultured in un-coated wells in the presence of SpherM. After 5–7 days spheroids were either video-recorded or fixed for further immunofluorescence or induced to differentiate. For the BrdU-uptake experiments, 10 μM BrdU (Sigma) was added from the beginning, but a toxic effect was seen with longer treatments than 5 days; to evaluate the % of cell division in spheroids of different days BrdU was added for the last 12 hours of incubation before fixation. To differentiate each spheroid was carefully picked with a P1000 pipet under the microscope and placed in poly-L-lysine or Collagen type IV treated Cultureslides (BD) in 10% FCS-SpherM. The following day, the medium was replaced during 14 days by any of the differentiated media DiM 1–4. Immunofluorescence of spheroids was performed pipetting them on top of 8 μm inserts (Millipore) and fixing them with 70% Ethanol at room temperature during 30 minutes, plus 4 M HCL during 20 minutes (BrdU labeling) or with -20°C Methanol for 5 minutes for the other antibodies before proceeding as above. Differentiated cells were fixed in Methanol (hormones) or in 4% paraformaldehyde for 20 minutes (hormones, Tubulin-beta III, NF).

BrdU retaining technique

Three days old rats were injected subcutaneously with 50 $\mu\text{g}/\text{g}$ BrdU (Sigma) in 0.9% NaCl twice/day during 3.5 days. 60 days later, animals were sacrificed and pituitaries frozen as above. Cryosections were fixed in -20°C Methanol for 10 minutes, washed and incubated in 4 M HCl for 20 minutes. After washing, immunofluorescence with anti-BrdU (BD) was performed as above.

Confocal quantitative telomere FISH (Telomapping)

For telomapping, paraffin-embedded tissue sections were hybridized with a PNA-tel Cy3-labelled probe and telomere length was determined as described [46]. DAPI, Cy3 signals were acquired simultaneously into separate channels using a confocal ultraspectral microscope (Leica TCS-SP2-A-OBS-UV) using a PL APO 20 \times /0.70 PH 2 as lens with Leica LCS software and maximum projections from image stacks (10 sections at steps 1.0 μm) were generated for image quantification. The DAPI image was used to define the nuclear area and the Cy3 image to quantify of telomere fluorescence. The binary DAPI mask was applied to the matching Cy3 to obtain a combined image with telomere fluorescence information for each nucleus. Cy3 fluorescence intensity (telomere fluorescence) was measured as “average gray values” (total gray value/nuclei area) units (arbitrary units of fluorescence). These “average telomere fluorescence” values always represent the average Cy3 pixel intensity for the total nuclear area, and not the average value of individual telomere spot

intensities, therefore ruling out that differences in nuclear size may influence telomere length measurements.

Supporting Information

Figure S1 Expression of GFRa2 and b-Catenin in the adenopituitary A) GFRa2 mRNA expression in the rat adenopituitary (AP) is comparable with the testes, a gland well known for its GFR alpha expression. B) GFRa2 stains about 0.9% of all AP cells detected by flow cytometry after specific binding of anti-GFRa2 antibody. The enzyme dispersed suspension of mouse-adenopituitary cells were sequentially incubated with anti-GFRa2 antibody followed by FITC-anti-rabbit antibody (see Supplementary Tables S1 and S2). The cell suspension was analyzed by cytometry; in red the analyzed FITC+ population and in blue the sorted population presenting the strongest FITC signal. In the negative control (only Ig, secondary antibody) this population was less than <0.1%, while in the GFRa2+ samples accounted for around 0.9% of the total cell suspension. The GFRa2+ population is composed of homogeneous small cells as seen by the low level of the sorted population on the FSC in comparison with the non-FITC population or with the faint FITC+ within the control. C) Low magnifications of a whole section of a rat pituitary (DAPI) and the b-Catenin enrichment at the niche between AP and IL. The only pituitaries small enough to picture like this were from 10-days old rats. AP, adenopituitary; IL, intermediate lobe; NP, neuropituitary.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s001 (0.92 MB PDF)

Figure S2 The GPS niche is weakly positive for RET but does not express Pit-1, Nanog, GFRa1, Nestin or Sox4. A) The GPS niche is negative for Pit1, a pituitary transcription factor expressed by somatotrophs (GH), lactotrophs and thyrotrophs, as is negative for GH. B) The GPS niche is also negative for Nanog. Nanog staining is only observed in the IL and does not overlap with b-Catenin at the niche. C) The Ret tyrosine-kinase receptor stains specific cells in the AP (mostly somatotrophs, [1,2], and it is also expressed in neurons of the NP. It also weakly stains the GFRa2+ niche; however the GPS cells are negative for GFRa1. D) The Nestin+ cells of the pituitary are dispersed through the IL and the AP [3], but do not coincide with the GPS. E) Sox4 is expressed in the mouse AP but it is not a marker of the GPS niche. F) Western blot of GFRa2 and Neurturin (NTN) in rat and human adenopituitary. Hela cells are a human positive control for GFRa2. PRL has a slight interspecies difference in MW.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s002 (1.71 MB PDF)

Figure S3 Differentiation and proliferation properties of GFRa2-purified cells in vitro. A) The spheroids are clonal: A representative experiment is shown where GFRa2+ cells were diluted in SpherM to 18 cells/ml and seeded into the first column of a 24-well dish. Further dilutions 1:2 were performed in the following wells. Five days later all the spheroids per well were counted (white numbers in the middle of the wells) and photographed to be able to appreciate an approximate number of cells/spheroid. In those wells where more than 4 spheroids were found, a picture of four of them is shown. B) GFRa2 spheroids express Prop1 and thin lines of b-Catenin and are negative for PRL. C) Neurturin (NTN), the GFRa2 ligand, functions as a physiological promoter of spheroid formation when cells are cultured under sub-optimal conditions (0.5x: medium diluted by half) of SpherM culture media. D) Three ways of culturing MACS purified GFRa2+ cells render different phenotypes: a) In uncoated

dishes with SpherM, GFRa2+ grow as spheroids as described; b) cultured on gelatin-coated dishes using 50% of conditioned medium from MEFs (MEFM), they attach to the surface and grow as GFRa2+/Prop1+ scattered cells. However, with passages some differentiated groups of cells forming cord-like structures or red-pigmented colonies appear and the scattered GPS cell number is less; c) when cultured directly on top of mitomycin-treated MEFs (as frequently used for embryonic stem cells), GFRa2+ cells form colonies that present cilia in the apical pole (Supplementary Video 6). E) Adding Esgro to the MEFM (MEFM+E), the cells did not attach to the gelatin-coated surface, but grew slowly but steadily as compact spheres. They were passaged every 25 days. We show here four independent cultures five days after passage. As expected, GPS cells cultured on top of MEF carried on with passages forming colonies (black arrows), although some isolated differentiated cells appeared.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s003 (1.32 MB PDF)

Figure S4 Cdk4 null mouse but not Cdk4(R/R) has hypopituitarism A) Sagittal microphotographs of pituitaries from Cdk4(+/+), Cdk4(n/n) and Cdk4(R/R) 2-month-old mice. B) The total number of hormone-producing cells is decreased in young (2–4 months-old) Cdk4-deficient mouse pituitaries and they have smaller pituitaries (panel A and Figure 6). However, the relative percentage of hormone-producing cells is not grossly altered in Cdk4-deficient mice, suggesting an overall deficiency in the production of all these cells from these progenitors. C) Adult female mice present a physiological increase in lactotroph cells in comparison with males that is maintained in the Cdk4-null mice, in spite of having a much less number of total lactotrophs. Cdk4(R/R) mice recover normal amount of lactotrophs. In the left, serum prolactin levels in the animals were analyzed by immunoassay. D) Representative images of hormone-producing cells in Cdk4(n/n) mice.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s004 (0.34 MB PDF)

Video S1 Three dimensional reconstruction of the rat AP niche using b-Catenin staining (green).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s005 (1.81 MB AVI)

Video S2 Three dimensional reconstruction of the rat AP niche using all channels together, DAPI (Nuclei) blue, GFRa2 (red membrane staining), and b-Catenin (green).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s006 (1.78 MB MPG)

Video S3 Spheroid with beating cilia in one pole.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s007 (1.05 MB AVI)

Video S4 Hollow spheroid moving against another.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s008 (5.24 MB AVI)

Video S5 Hollow spheroid moving fast through the culture dish.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s009 (3.55 MB AVI)

Video S6 Compact spheroid with cilia.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s010 (2.32 MB AVI)

Video S7 Colony of GFRa2+ cells grown on top of mitomycin-treated MEFs for two weeks, with cilia beating on the surface.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s011 (2.74 MB AVI)

Methods S1

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s012 (8.22 MB DOC)

Table S1 List of Antibodies and dilutions. Primary Antibodies

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s013 (0.06 MB DOC)

Table S2 List of secondary antibodies and related reagents.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s014 (0.04 MB DOC)

Table S3 Oligonucleotides used to analyze gene expression by RT-PCR.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0004815.s015 (0.03 MB DOC)

Acknowledgments

We thank Esther Rodríguez Díez and Rocío Sotillo for help with citometry and mouse analysis, Sihara Pérez for her assistance with PCR, Mercedes

Rivas and Francisco Porto (Leica) for their help with confocal and 3D reconstructions, and Pierre Dubus for suggestions on pituitary tumor pathology.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MGL VQ MAJ AKR MAB CD MM CVA. Performed the experiments: MGL VQ IF CS EDR. Analyzed the data: MGL VQ IF CS MAJ MM CVA. Contributed reagents/materials/analysis tools: AKR MAB MM CVA. Wrote the paper: CD MM CVA. Managing and Providing funds for the research: CVA MAB CD MM.

References

- Vankelecom H (2007) Non-hormonal cell types in the pituitary: candidates for stem cell. *Semin Cell Dev Biol* 18(4): 559–570.
- Allaerts W, Vankelecom H (2005) History and perspectives of pituitary folliculostellate cell research. *Eur J Endocrinol* 153(1): 1–12.
- Horvath E, Kovacs K (2002) Folliculo-stellate cells of the human pituitary: A type of adult stem cell? *Ultrastruct Pathol* 26(4): 219–228.
- Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG (2007) Molecular physiology of pituitary development: Signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* 87(3): 933–963.
- Vankelecom H (2007) Stem cells in the postnatal pituitary? *Neuroendocrinology* 85(2): 110–130.
- Melmed S (2003) Mechanisms for pituitary tumorigenesis: The plastic pituitary. *J Clin Invest* 112(11): 1603–1618.
- Chen J, Hersmus N, Van Duppen V, Caesens P, Deneef C, et al. (2005) The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology* 146(9): 3985–3998.
- Lepore DA, Roeszler K, Wagner J, Ross SA, Bauer K, et al. (2005) Identification and enrichment of colony-forming cells from the adult murine pituitary. *Exp Cell Res* 308(1): 166–176.
- Lepore DA, Jokubaitis VJ, Simmons PJ, Roeszler KN, Rossi R, et al. (2006) A role for angiotensin-converting enzyme in the characterization, enrichment, and proliferation potential of adult murine pituitary colony-forming cells. *Stem Cells* 24(11): 2382–2390.
- Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson IC (2008) SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(8): 2907–2912.
- Gleiberman AS, Michurina T, Encinas JM, Roig JL, Krasnov P, et al. (2008) Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(17): 6332–6337.
- Arighi E, Borrello MG, Sariola H (2005) RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(4–5): 441–467.
- Bespalov MM, Saarna M (2007) GDNF family receptor complexes are emerging drug targets. *Trends Pharmacol Sci* 28(2): 68–74.
- Airaksinen MS, Saarna M (2002) The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3(5): 383–394.
- Heuckeroth RO, Enomoto H, Grider JR, Golden JP, Hanke JA, et al. (1999) Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* 22(2): 253–263.
- Rossi J, Luukko K, Poteryaev D, Laurikainen A, Sun YF, et al. (1999) Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor. *Neuron* 22(2): 243–252.
- Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, et al. (2000) Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 287(5457): 1489–1493.
- Widenfalk J, Parvinen M, Lindqvist E, Olson L (2000) Neurturin, RET, GFRalpha-1 and GFRalpha-2, but not GFRalpha-3, mRNA are expressed in mice gonads. *Cell Tissue Res* 299(3): 409–415.
- Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M (2005) Isolation of male germ-line stem cells: influence of GDNF. *Dev Biol* 279(1): 114–124.
- Urbano AG, Suarez-Penaranda JM, Dieguez C, Alvarez CV (2000) GDNF and RET-gene expression in anterior pituitary-cell types. *Endocrinology* 141(5): 1893–1896.
- Japon MA, Urbano AG, Saez C, Segura DI, Cerro AI, et al. (2002) Glier-derived neurotrophic factor and RET gene expression in normal human anterior pituitary cell types and in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87(4): 1879–1884.
- Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, et al. (1996) Pituitary lineage determination by the transcription of pit-1 homeodomain factor defective in ames dwarfism. *Nature* 384(6607): 327–333.
- Wu W, Cogan JD, Pfaffle RW, Dasen JS, Frisch H, et al. (1998) Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet* 18(2): 147–149.
- Fofanova O, Takamura N, Kinoshita E, Parks JS, Brown MR, et al. (1998) Compound heterozygous deletion of the PROP-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 83(7): 2601–2604.
- Nasonkin IO, Ward RD, Raetzman LT, Seasholtz AF, Saunders TL, et al. (2004) Pituitary hypoplasia and respiratory distress syndrome in Prop1 knockout mice. *Hum Mol Genet* 13(22): 2727–2735.
- Ward RD, Raetzman LT, Suh H, Stone BM, Nasonkin IO, et al. (2005) Role of PROP1 in pituitary gland growth. *Mol Endocrinol* 19(3): 698–710.
- Zallen JA (2007) Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* 129(6): 1051–1063.
- Nakajima T, Yamaguchi H, Takahashi K (1980) S100 protein in folliculostellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res* 191(2): 523–531.
- Marin F, Boya J, Lopez-Carbonell A, Borregon A (1989) Immunohistochemical localization of intermediate filament and S-100 proteins in several non-endocrine cells of the human pituitary gland. *Arch Histol Cytol* 52(3): 241–248.
- Itakura E, Odaira K, Yokoyama K, Osuna M, Hara T, et al. (2007) Generation of transgenic rats expressing green fluorescent protein in S-100beta-producing pituitary folliculo-stellate cells and brain astrocytes. *Endocrinology* 148(4): 1518–1523.
- Marin F, Boya J, Lopez-Carbonell A (1989) Immunocytochemical localization of vimentin in stellate cells (folliculo-stellate cells) of the rat, cat and rabbit pituitary pars distalis. *Anat Embryol (Berl)* 179(5): 491–495.
- Kasper M, Karsten U (1988) Coexpression of cytokeratin and vimentin in Rathke's cysts of the human pituitary gland. *Cell Tissue Res* 253(2): 419–424.
- Krylyshkina O, Chen J, Mebis L, Deneef C, Vankelecom H (2005) Nestin-immunoreactive cells in rat pituitary are neither hormonal nor typical folliculo-stellate cells. *Endocrinology* 146(5): 2376–2387.
- Park TJ, Haigo SL, Wallingford JB (2006) Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and hedgehog signaling. *Nat Genet* 38(3): 303–311.
- Shanklin WM (1951) The incidence and distribution of cilia in the human pituitary with a description of microfollicular cysts derived from Rathke's cleft. *Acta Anat (Basel)* 11(2–3): 361–382.
- Yoshimura F, Soji T, Kiguchi Y (1977) Relationship between the follicular cells and marginal layer cells of the anterior pituitary. *Endocrinol Jpn* 24(3): 301–305.
- Islam O, Butt T, Abrahams J (2007) Rathke cleft cysts. <http://www.Emedicine.com/radio/topic594.htm>.
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102(4): 451–461.
- Welm BE, Tepera SB, Venezia T, Graubert TA, Rosen JM, et al. (2002) Scap1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol* 245(1): 42–56.
- Chan RW, Gargett CE (2006) Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem Cells* 24(6): 1529–1538.
- Kuwahara R, Kofman AV, Landis CS, Swenson ES, Barendsward E, et al. (2008) The hepatic stem cell niche: Identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 47(6): 1994–2002.
- Duvillie B, Attali M, Aiello V, Quemenour E, Scharfmann R (2003) Label-retaining cells in the rat pancreas: Location and differentiation potential in vitro. *Diabetes* 52(8): 2035–2042.
- Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q (2004) The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* 114(6): 795–804.
- Moore KA, Lemischka IR (2006) Stem cells and their niches. *Science* 311(5769): 1880–1885.
- Fuchs E, Tumber T, Gusch G (2004) Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell* 116(6): 769–778.

46. Flores I, Canela A, Vera E, Tejera A, Cotsarelis G, et al. (2008) The longest telomeres: A general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev* 22: 654–667.
47. Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, Glimcher LH, Fuchs E (2008) NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* 132(2): 299–310.
48. Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, et al. (1999) Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* 22(1): 44–52.
49. Martin J, Hunt SL, Dubus P, Sotillo R, Nehme-Pelluard F, et al. (2003) Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* 22(34): 5261–5269.
50. Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, Galan J, Cerezo A, et al. (2004) Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118(4): 493–504.
51. Desai B, Berrin JM, Nott CA, Geddes JF, Lamb EJ, et al. (1995) Glycoprotein hormone alpha-subunit production and plurihormonality in human corticotroph tumours—an in vitro and immunohistochemical study. *Eur J Endocrinol* 133(1): 25–32.
52. Matsuno A, Sasaki T, Mochizuki T, Fujimaki T, Sanno N, et al. (1996) A case of pituitary somatotroph adenoma with concomitant secretion of growth hormone, prolactin, and adrenocorticotrophic hormone—an adenoma derived from primordial stem cell, studied by immunohistochemistry, in situ hybridization, and cell culture. *Acta Neurochir (Wien)* 138(8): 1002–1007.
53. Kovacs K, Horvath E, Stefancanu L, Bilbao J, Singer W, et al. (1998) Pituitary adenoma producing growth hormone and adrenocorticotropin: A histological, immunocytochemical, electron microscopic, and in situ hybridization study. *case report. J Neurosurg* 88(6): 1111–1115.
54. Ulloa-Montoya F, Kidder BL, Pauwelyn KA, Chase LG, Luttun A, et al. (2007) Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. *Genome Biol* 8(3): R163.
55. Ueda S, Kawamata M, Teratani T, Shimizu T, Tamai Y, et al. (2008) Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats. *PLoS ONE* 3(7): e2800.
56. Dodd J, Solter D, Jessell TM (1984) Monoclonal antibodies against carbohydrate differentiation antigens identify subsets of primary sensory neurones. *Nature* 311(5985): 469–472.
57. Li HY, Say EH, Zhou XF (2007) Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells* 25(8): 2053–2065.
58. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC (2007) SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 109(4): 1743–1751.
59. Scadden DT (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441(7097): 1073–1079.
60. Xie T, Li L (2007) Stem cells and their niche: An inseparable relationship. *Development* 134(11): 2001–2006.
61. Lawrence PA, Struhl G, Casal J (2007) Planar cell polarity: One or two pathways? *Nat Rev Genet* 8(7): 555–563.
62. He Z, Jiang J, Hofmann MC, Dym M (2007) Gfral silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of RET tyrosine kinase. *Biol Reprod* 77(4): 723–733.
63. Canibano C, Rodriguez NL, Saez C, Tovar S, Garcia-Lavandeira M, et al. (2007) The dependence receptor ret induces apoptosis in somatotrophs through a pit-1/p53 pathway, preventing tumor growth. *EMBO J* 26(8): 2015–2028.
64. Fantes J, Ragge NK, Lynch SA, McGill NI, Collin JR, et al. (2003) Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet* 33(4): 461–463.
65. Ferri AL, Cavallaro M, Braidia D, Di Cristofano A, Canta A, et al. (2004) Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131(15): 3805–3819.
66. Hagstrom SA, Pauer GJ, Reid J, Simpson E, Crowe S, et al. (2005) SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies. *Am J Med Genet A* 138(2): 95–98.
67. Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Grindzic M, Cianfarani S, et al. (2006) Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest* 116(9): 2442–2455.
68. Ward RD, Stone BM, Raetzman LT, Camper SA (2006) Cell proliferation and vascularization in mouse models of pituitary hormone deficiency. *Mol Endocrinol* 20(6): 1378–1390.
69. Bottner A, Keller E, Kratzsch J, Stobbe H, Weigel JF, et al. (2004) PROP1 mutations cause progressive deterioration of anterior pituitary function including adrenal insufficiency: A longitudinal analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 89(10): 5256–5265.
70. Vallette-Kasic S, Barlier A, Teinturier C, Diaz A, Manavela M, et al. (2001) PROP1 gene screening in patients with multiple pituitary hormone deficiency reveals two sites of hypermutability and a high incidence of corticotroph deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 86(9): 4529–4535.
71. Andersen B, Pearce RV 2nd, Jenne K, Sornson M, Lin SC, et al. (1995) The Ames dwarf gene is required for pit-1 gene activation. *Dev Biol* 172(2): 495–503.
72. Cushman LJ, Watkins-Chow DE, Brinkmeier ML, Raetzman LT, Radak AL, et al. (2001) Persistent Prop1 expression delays gonadotrope differentiation and enhances pituitary tumor susceptibility. *Hum Mol Genet* 10(11): 1141–1153.
73. Vesper AH, Raetzman LT, Camper SA (2006) Role of prophet of Pit1 (PROP1) in gonadotrope differentiation and puberty. *Endocrinology* 147(4): 1654–1663.
74. Melmed S (2003) Mechanisms for pituitary tumorigenesis: The plastic pituitary. *J Clin Invest* 112(11): 1603–1618.
75. Li H, Liu H, Heller S (2003) Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 9(10): 1293–1299.
76. U HS, Allilain W, Saljoogue F (2002) Fetal brain progenitor cells transdifferentiate to fates outside the nervous system. *Mol Endocrinol* 16(11): 2645–2656.
77. Johnson MD, Fan X, Bourne P, Walters D (2007) Neuronal differentiation and expression of neural epitopes in pituitary adenomas. *J Histochem Cytochem* 55(12): 1265–1271.
78. Franklin DS, Godfrey VL, Lee H, Kovalev GI, Schoonhoven R, et al. (1998) CDK inhibitors p18^{INK4c} and p27^{Kip1} mediate two separate pathways to collaboratively suppress pituitary tumorigenesis. *Genes Dev* 12(18): 2899–2911.
79. Latres E, Malumbres M, Sotillo R, Martin J, Ortega S, et al. (2000) Limited overlapping roles of P15^{INK4b} and P18^{INK4c} cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J* 19(13): 3496–3506.
80. Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, et al. (1996) Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27^{Kip1}. *Cell* 85(5): 721–732.
81. Suh H, Gage PJ, Drouin J, Camper SA (2002) Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: Pituitary primordium formation and cell specification. *Development* 129(2): 329–337.
82. Garcia A, Alvarez CV, Smith RG, Dieguez C (2001) Regulation of pit-1 expression by ghrelin and GHRP-6 through the GH secretagogue receptor. *Mol Endocrinol* 15(9): 1484–1495.

A GRFa2/Prop1/Stem (GPS) Cell Niche in the Pituitary

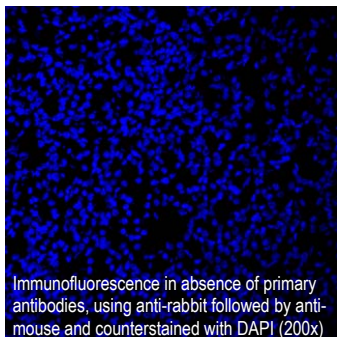
by Montse Garcia-Lavandeira *et al.*

Supplementary Methods

Immunodetection. For immunofluorescence, rat pituitaries were oriented and immersed in an OCT-filled plastic cryomold (Sakura) and frozen inside a glass beaker filled with isopentane previously immersed in liquid N₂; frozen cryomolds were maintained at -80°C until sectioned in 10 µm cryosections.

The sections were fixed and processed as described in the main text.

Double immunofluorescences were performed in consecutive days; to prevent secondary antibody backgrounds, the order was dependent on the species of the primary antibody: first day goat, guinea pig or rabbit, second day rabbit or mouse respectively. Negative controls (using PBS instead of primary antibody)

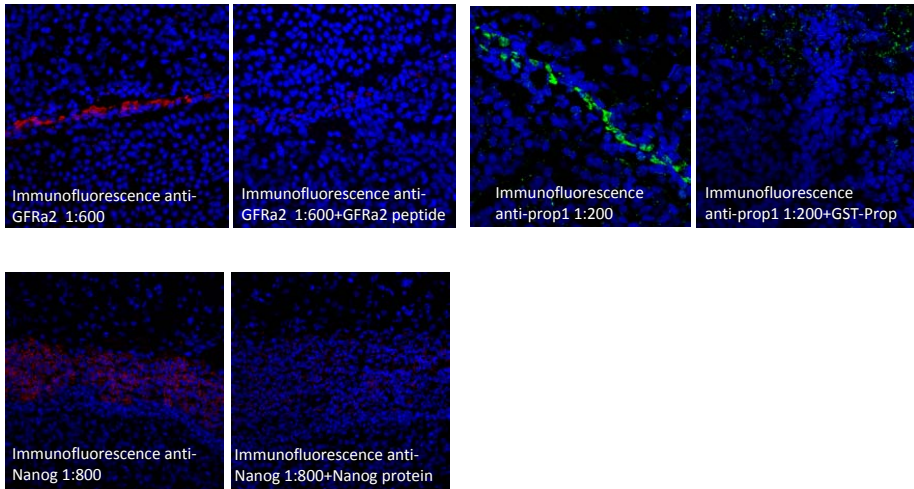


were routinely run in parallel (see left picture).

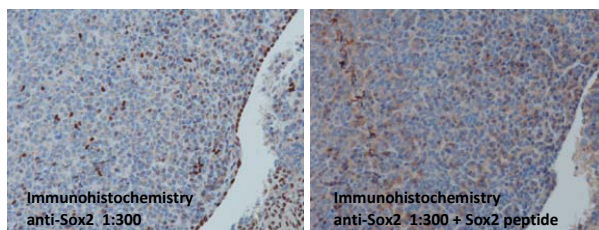
Preadsorbed controls, where the antibodies were previously incubated overnight with an excess of the peptide (GFRa2, Abcam), the

fusion protein (GST-Prop₁₅₅₋₂₂₃) or the full-length protein (Nanog, Abcam) were

also performed; the intensity of the specific signal was practically abolished (see pictures). Nuclei were counterstained with 20 µg/ml DAPI (Sigma). A TCS-SP2-DMRE Confocal Microscope with Ar, He/Ne 543 and He/Ne 633 Lasers (Leica) and LCS software was used to analyze the results.



Negative and preadsorption (Sox2 peptide, Chemicon AG980) controls were also used for immunohistochemistry in human and mouse sections.



For a detailed list on antibodies and dilutions see Supplementary Table S1 and S2.

For immunoblotting, tissues or cells were lysed as previously described [4, 5]. Shortly, after adding 1% SDS at 95 °C during 5 minutes the lysate was diluted 1:5 with 50mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton, 5 mM EGTA, 1.5 mM MgCl supplemented with 0.1 M PMSF (Sigma), 5mg/ml Aprotinine (Sigma), 2% Na₃VO₄ (Sigma), 0.1 M Na-pyrophosphate (Sigma), homogenized through a 20 gauge syringe and incubated for 20 minutes on ice. Lysates were spun for 5 minutes at 14000 rpm and supernatants kept at -20 °C. 75 microg of total proteins were load in 8-15 % SDS-PAGE gels. Incubation with primary antibodies was performed overnight (see Supplementary Table S1 and S2 for dilutions) and alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies and the CSS system (Tropix) were used for immunodetection.

Sorting of GFRa2+ cells. Pituitaries from wild type male mouse were dissected and mechanically minced in PBS-1 (PBS supplemented with 2.7 mg/ml D-glucose, 10 mg/ml BSA, 0.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂). Fragments were further digested with 0.1% Collagenase type IA (Sigma), 0.05% (100 IU/ml) DNase, 5 mM CaCl₂ in PBS for 45 minutes with gentle agitation. After centrifuging, cells

were washed for 15 minutes in PBS-2 (PBS supplemented with 2.7 mg/ml D-glucose, 10 mg/ml BSA) with gentle agitation. After this washing, cells were centrifuged and divided in two identical aliquots. The first aliquot was incubated during 45 minutes with 1: 50 anti-GFRa2 in PBS-3 (PBS supplemented with 0.5% FCS and 0.1% NaN₃); the second aliquot was maintained in the same volume of PBS-3 with rabbit Ig, without antibody. After the incubation, and two further washings in PBS-3, both aliquots were incubated during 45 minutes, in the dark and with gentle agitation, with 1:50 chicken anti-rabbit Alexa 488 (Molecular Probes, A21441) in PBS-3. After two last washes in PBS-3, cells were analyzed in a FACScanto (Becton Dickinson).

Isolation and culture of GFRa2+ cells. Freshly isolated cell suspensions were prepared from male rat or mouse pituitaries using magnetic activated cell sorting (MACS; Miltenyi) or a fluorescence-activated cell sorter (FACS; FACS Aria, Becton-Dickinson). Murine AP cells were dissected from NP and IL, washed in DMEM (Sigma) and incubated with 0.4% Collagenase type IA (Sigma), 0.05% (100 IU/ml) DNase I (Sigma) (without/with 0.5% Trypsin,

Sigma) in DMEM supplemented with 20% horse serum (HS, Gibco) in the incubator; mechanical dispersion was performed each 5 minutes. After 20 minutes, dispersed cells were washed twice in 20 % HS-DMEM and incubated with rabbit anti-GFRa2 antibody for 30 minutes at room temperature. After this incubation, 1 ml of 0.5% BSA (Sigma), 2mM EDTA in PBS (pH: 7) was added and cells were washed and resuspended in 200 μ l of the same buffer plus 50 ml of anti-rabbit Microbeads (Miltenyi) for 15 minutes at 4°C. After washing, cell-beads suspension was flowed through an MS Column (Miltenyi) attached to the magnetic separator (MiniMACS), with two 500 μ l washings (GFRa2- cells). GFRa2+ cells were eluted in 1 ml of media and cultured as follows (all the experiments with spheroids shown were performed with rat cells, although many have been reproduced in mouse cells, data not shown):

a) As spheroids: GFRa2+ cells were eluted in 1 ml of **SpherM:** 1x N2 (Invitrogen), 1x B27 (Invitrogen), 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 2.5 μ g/ml amphotericin-B in 1:1 DMEM/F12 (vol/vol) medium. 2500 cells were cultured in a p35 dish. After 5-7 days spheroids were either video-recorded or fixed for further immunofluorescence or

induced to differentiate. For the BrdU-uptake experiments, 10 microM BrdU (Sigma) was added from the beginning, but a toxic effect was seen with longer treatments than 5 days; to evaluate the % of cell division in spheroids of different days BrdU was added for the last 12 hours of incubation before fixation. To study clonality, e.g. that the spheroids originated from a single cell, cells were also seeded in lower dilutions 20-18 cells/ml in 24-well dishes, and further diluted 1:2 in the following columns up to 0,5 cells/ml. After five days all the spheroids were photographed (Supplementary Figure 3A).

To induce differentiation, every individual spheroid was carefully pipetted under the microscope at day 5, isolated and placed in Collagen type IV or poly-L-lysine treated Cultureslides (BD) in 10 % FCS-SpherM. The following day, the medium was replaced during 15 days by one of the following differentiation media (**DifM**):

-DifM1: 1:1 SSM+ conditioned medium from the rat-pituitary cell line GH4C1 (vol/vol) supplemented with antibiotics. The SSM or Semisynthetic medium has been previously described by our group for primary pituitary culture [4-6]

[6,5:3,5 DMEM/Ham's F12 medium (vol/vol) supplemented with (Sigma):
(per liter) BSA (2 g), HEPES (2.38 g), hydrocortisone (143 µg), T3 (0.4 µg),
Transferrin (10 mg), Glucagon (10 ng), Epidermal growth factor (0.1 µg), and
Fibroblast growth factor (0.2 µg)]. The **conditioned medium from the GH4C1**
was obtained by culturing the cell-line in DMEM+10%FCS; after 6 days
without change, the medium was collected, filtered and frozen in aliquots.

**-DifM 2: 1: 1 DMEM/Ham's F12 (1:1), 1x N2 + conditioned medium from the
rat-pituitary cell line GH4C1 (vol/vol) supplemented with antibiotics.**

-DifM 3: 1x N2, 1% FBS in SSM supplemented with antibiotics.

**-DifM 4: 1x B27, 0,5 ng/ml FGF, 10⁻⁹ M GHRH, 10⁻⁹ M Ghrelin, 10⁻⁹M
Somatostatin, 10⁻⁹M Hydrocortisone, 5 microg/ml Transferrin, 10 microg/ml
Insulin in 1:1 DMEM/Ham's F12 (vol/vol) supplemented with antibiotics.**

**-DifM5: 1:1 SSM+ conditioned medium from the rat-pituitary cell line GH3
(vol/vol) supplemented with antibiotics. The **conditioned medium from the
GH3** was obtained by culturing the cell-line in DMEM+2,5%FCS+15% Horse
Serum; after 6 days without change, the medium was collected, filtered and
frozen in aliquots.**

b) **As attached cell culture:** GFRa2+ were eluted in 1 ml of **MEFM** and seeded in gelatin-coated wells [**MEFM: 1:1 StemM + conditioned medium from MEFs (vol/vol).** **StemM** (Millipore): 1% non-essential aminoacids, 2mM Glutamine, 0,1mM b-mercaptoethanol, 20% serum-KO replacement, 80% KO-DMEM supplemented with antibiotics. **Conditioned medium from MEF:** mouse embryonic fibroblasts were passaged in DMEM containing 20% FBS and treated with mytomicin. To obtain Conditioned medium, they were incubated in StemM (1% non-essential aminoacids, 2mM Glutamine, 0,1 mM b-mercaptoethanol 20% serum-KO replacement, 80% KO-DMEM supplemented with antibiotics); after 6 days without change, the medium was collected, filtered and frozen in aliquots.

The cells were passed every 25 days but we observed that many cells differentiated on the dish in these conditions.

c) **As floating spheres:** When cells were cultured in MEFM plus 1000 U/ml Esgro (Chemicon) (**MEFM-E**) they did not attach to the coated dish nor differentiate; they grew as groups of cells floating in the medium. They grew

slowly but steady and were passed every 25 days, by centrifugation, pipet-dispersion and dilution 1:3.

d) **As embryonic-like colonies:** MEF fibroblasts were treated with mitomycin as described and frozen in aliquots. When required, an aliquot was thawed and fibroblast seeded as a monolayer. The next day, GFRa2+ purified cells were eluted in **StemM** and overlaid on top of the MEF monolayer. Two-week later colonies were formed. Attached or floating Colonies were routinely passed every 25 days with the help of Accutase (Chemicon).

Immunofluorescence of spheroids was performed pipetting them on top of 8 μ m inserts (Millipore) and fixing them with 70 % Ethanol at room temperature during 30 minutes, plus 4M HCL during 20 minutes (BrdU labeling) or with -20 °C Methanol for 5 minutes for the other antibodies before proceeding as above. Differentiated cells were fixed in Methanol (hormones) or in 4 % paraformaldehyde for 20 minutes (hormones, Tubulin-beta-III, NF). (See below for antibodies and dilutions).

Confocal quantitative telomere FISH (Telomapping). For telomapping, paraffin-embedded tissue sections were hybridized with a PNA-tel Cy3-labelled probe and telomere length was determined as described [7]. Slides were deparaffinized in three xylene washes (3 minutes each), then treated for 3 minutes with a 100, 95 and 70% ethanol series, followed by telomere Q-FISH protocol performed as described [8]. DAPI, Cy3 signals were acquired simultaneously into separate channels using a confocal ultraspectral microscope (Leica TCS-SP2-A-OBS-UV) using a PL APO 20x/0.70 PH2 as lens with Leica LCS software and maximum projections from image stacks (10 sections at steps 1.0 microM) were generated for image quantification. The DPSS-561 laser (Cy3 laser) was held at a constant intensity to capture all the mouse tissues images. Highthroughput quantitative image analysis was performed on confocal images using the Metamorph platform (version 6.3r6; Molecular Devices, Union City, CA). The DAPI image was used to define the nuclear area and the Cy3 image to quantify of telomere fluorescence. In all cases, background noise was subtracted from each image prior to making qualitative measurements. The DAPI images were signal-intensity thresholded, segmented and converted to 1-bit binary image.

The binary DAPI mask was applied to the matching Cy3 to obtain a combined image with telomere fluorescence information for each nucleus. Cy3 fluorescence intensity (telomere fluorescence) was measured as “average gray values” (total gray value/nuclei area) units (arbitrary units of fluorescence). These "average telomere fluorescence" values always represent the average Cy3 pixel intensity for the total nuclear area, and not the average value of individual telomere spot intensities, therefore ruling out that differences in nuclear size may influence telomere length measurements. A code of four colors was used to classify the nuclei according to their average telomere fluorescence. Finally, telomere fluorescence values for each histological region were exported to Excel and the frequency histograms were generated.

Immunolabeled cell counting on paraffin sections

Mouse pituitaries were embedded in paraffin in either sagittal or coronal orientation. A Hematoxylin staining was performed in sections every 50 microm to detect the biggest section per pituitary. Immunohistochemistry was performed in three sections around the middle separated by at least 20 microm. A

minimum of 3 pituitaries per orientation and 250 cells per mice were scored (at least two males and two females). The number of cells per area was counted in sections. On the other hand, the volume of the pituitary was calculated using the following equation (volume of an ellipsoid):

$$\text{Pituitary volume} = (\text{Major axis} \times \text{Minor axis}^2)/2$$

(as mean among four mice per group).

qRT-PCR primers and conditions. Total RNA from male rat pituitaries was extracted with RNeasy Mini Kit (Quiagen). 1 μg RNA was reverse-transcribed using the standard protocol for MMLV (Invitrogen) in 20 μl reaction. 3 μl of the reaction were amplified with Cybergreen PCR mix (Roche) in a 7300 TaqMan (Applied), using the following conditions: 95°C 2", 60°C 15", 72°C 15". A list of the Oligonucleotides used is shown in Supplementary table S3.

References

1. Japon MA, Urbano AG, Saez C, Segura DI, Cerro AL, et al. (2002) Glial-derived neurotrophic factor and RET gene expression in normal human anterior pituitary cell types and in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87(4): 1879-1884.
2. Urbano AG, Suarez-Penaranda JM, Dieguez C, Alvarez CV. (2000) GDNF and RET-gene expression in anterior pituitary-cell types. *Endocrinology* 141(5): 1893-1896.
3. Krylyshkina O, Chen J, Mebis L, Denef C, Vankelecom H. (2005) Nestin-immunoreactive cells in rat pituitary are neither hormonal nor typical folliculo-stellate cells. *Endocrinology* 146(5): 2376-2387.
4. Canibano C, Rodriguez NL, Saez C, Tovar S, Garcia-Lavandeira M, et al. (2007) The dependence receptor ret induces apoptosis in somatotrophs through a pit-1/p53 pathway, preventing tumor growth. *EMBO J* 26(8): 2015-2028.
5. Garcia A, Alvarez CV, Smith RG, Dieguez C. (2001) Regulation of pit-1 expression by ghrelin and GHRP-6 through the GH secretagogue receptor. *Mol Endocrinol* 15(9): 1484-1495.
6. Coya R, Alvarez CV, Perez F, Gianzo C, Dieguez C. (1999) Effects of TGF-beta1 on prolactin synthesis and secretion: An in-vitro study. *J Neuroendocrinol* 11(5): 351-360.
7. Flores I, Canela A, Vera E, Tejera A, Cotsarelis G, et al. (2008) The longest telomeres: A general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev* 22: 654-667.

8. Samper E, Goytisolo FA, Slijepcevic P, van Buul PP, Blasco MA. (2000) Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep* 1(3): 244-252.

Supplementary Table S1. List of Antibodies and dilutions. Primary Antibodies

Protein	Species	Catalog N°	Company	Dilution			
				Tissue	Spheroid	Differentiation	WB
GFRa2	Rabbit	AB5141	Chemicon	1:500	1:50	1:50	1:600
GH	Rabbit	AFP-C11981A	NIDDK	1:800	1:300	1:300	1:1000
GH	Guinea pig	AFP 222 387 790	NIDDK	1:800			
ACTH	Mouse	M3501	Dako	1:100		1:50	
PRL	Mouse	E30610M	Biodesign	1:200	1:100	1:100	1:1000
beta-TSH	Goat	sc-7813	Santa Cruz B	1:200			
beta-TSH	Rabbit	AFP-1274789	NIDDK			1:50	
beta-FSH	Mouse	18-0020	Zymed Laboratories	1: 75		1:50	
beta-LH	Mouse	MS-9078-P	Neo Markers	1:250			
Cytokeratins	Mouse	NCL-C11	NovoCastr	1:45			
E-Cadherin	Mouse	C20820-050	BD biosciences	1:75	1:50		
b-Catenin(IF)	Mouse	05-665	Upstate	1:300	1:50		
b-Catenin(IHQ)	Rabbit	sc-1496	Santa Cruz B	1:200			
Oct4	Mouse	MAB4305	Chemicon	1:100	1:50		
SSEA-4	Mouse	MC-813-70	Hybridoma bank	1:50			
Nanog	Rabbit	Ab5731	Chemicon	1:800			
Prop1	Guinea pig	Against GST-Prop ¹⁵⁵⁻²³⁰ and His-Prop ¹⁵⁵⁻²³⁰	in house A.K. Ryan	1:250	1:50	1:50	1:500
S100 (rat)	Rabbit	RTU-RTUS100p	Novocastra	Commercially pre-diluted			
S100 (mouse, human)	Rabbit	Z0311	Dako	1:100 (mouse) 1:2000 (human)			
Vimentin (rat)	Rabbit	(H-84): sc-5565	Santa Cruz B	1:200			
Vimentin (mouse)	Guinea Pig	RDI-PROGP53	Fitzgerald	1:25 (Prot K)			
Vimentin (human)	Mouse	clone V9 M0725	Dako	1:500 (Citrate)			

Nestin	Mouse	Rat-401	Hybridoma bank	1:100			
Ki67(rat)	Mouse	M7248	Dako	1:250			
Ki67(mouse)	Mouse	000310Q10(SP6)	Master D	1:200			
Sox2	Mouse	MAB4343	Chemicon	1:100			
Sox2	Rabbit	AB5603	Chemicon	1:300 (IHQ) 1:500 (IF)			
Sox9	Rabbit	AB5535	Chemicon	1:200 (IHQ) 1:500 (IF)			
Sox4	Rabbit	S7318	Sigma	1:50			
NTN	Goat	AF477	R&D systems	1:100			1:500
Ret	Goat	sc-1290	Santa Cruz B	1:100			
Pit1	Rabbit	sc-442	Santa Cruz	1:300			
beta-Tubulin isotype III	Mouse	T8660	Sigma			1:100	
Neurofilament (PAN)	Mouse	FNP7,DA2,RmdO2011	Zymed			Commercially pre-diluted	

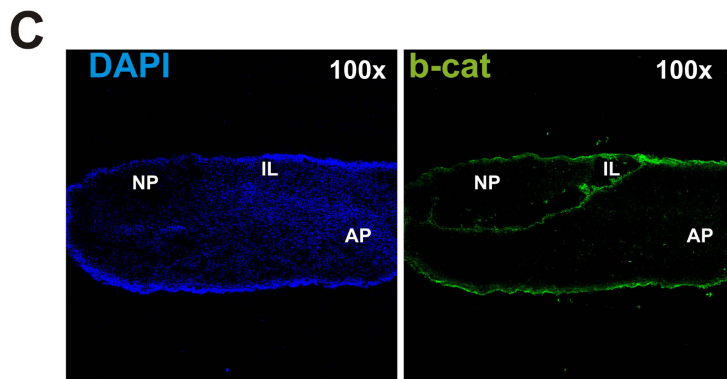
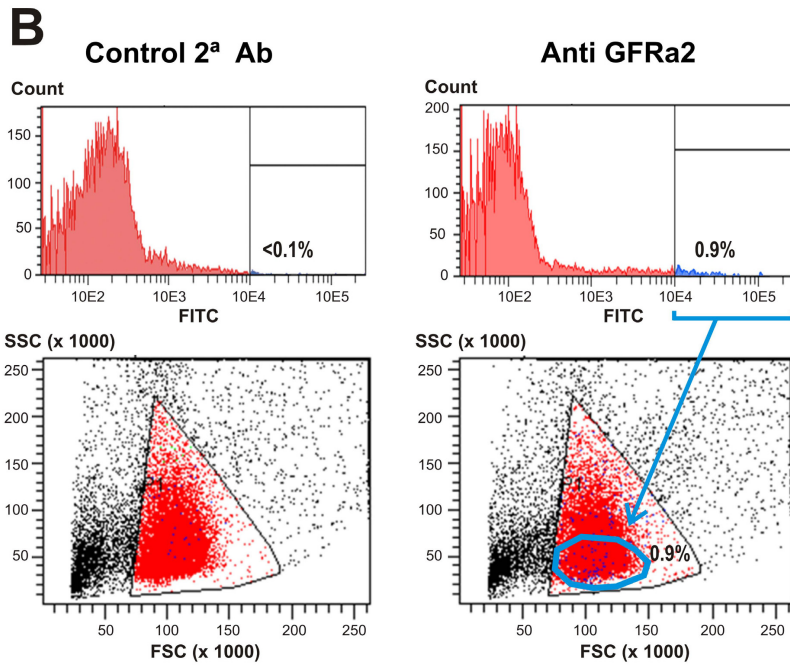
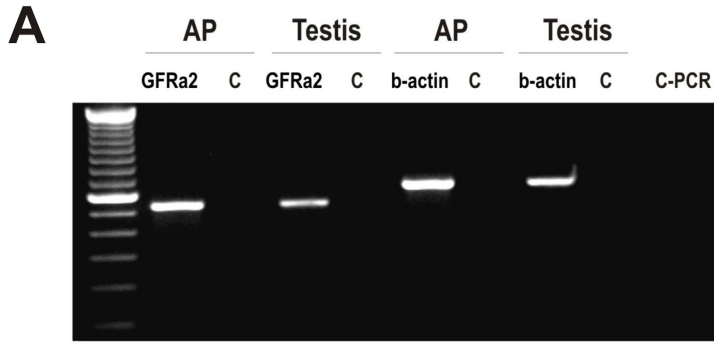
Supplementary Table S2. List of secondary antibodies and related reagents.

Secondary antibody	Labeling	Catalog number	Company	Dilution			
				Tissue	Spheroid	Differentiation	WB
Rabbit anti-Mouse	Cy TM 2	315-226-047	Jackson ImmunoResearch	1:1000	1:400	1:400	
Goat anti-Rabbit	Cy TM 3	111-166-047	Jackson ImmunoResearch	1:1000	1:600	1:600	
Donkey anti-Goat	Alexa Fluor 488	A-11055	Molecular Probes	1:250			
Goat anti-Guinea Pig	Alexa Fluor 488	A-11073	Molecular Probes	1:1500	1:600		
Goat anti-rabbit	Botinylated	BA-100	Vector Labs	1:200			
Goat anti-mouse	Biotinilated	BA-200	Vector Labs	1:200			
Goat anti-Rabbit	Alcaline phosphatase phosphatase	AC31RL	Tropix				1:5000
Goat anti-Mouse	Alcaline phosphatase phosphatase	AC32ML	Tropix				1:5000
Protein A	HRP	NA9120V	Amersham				1:5000

Supplementary Table S3. Oligonucleotides used to analyze gene expression by

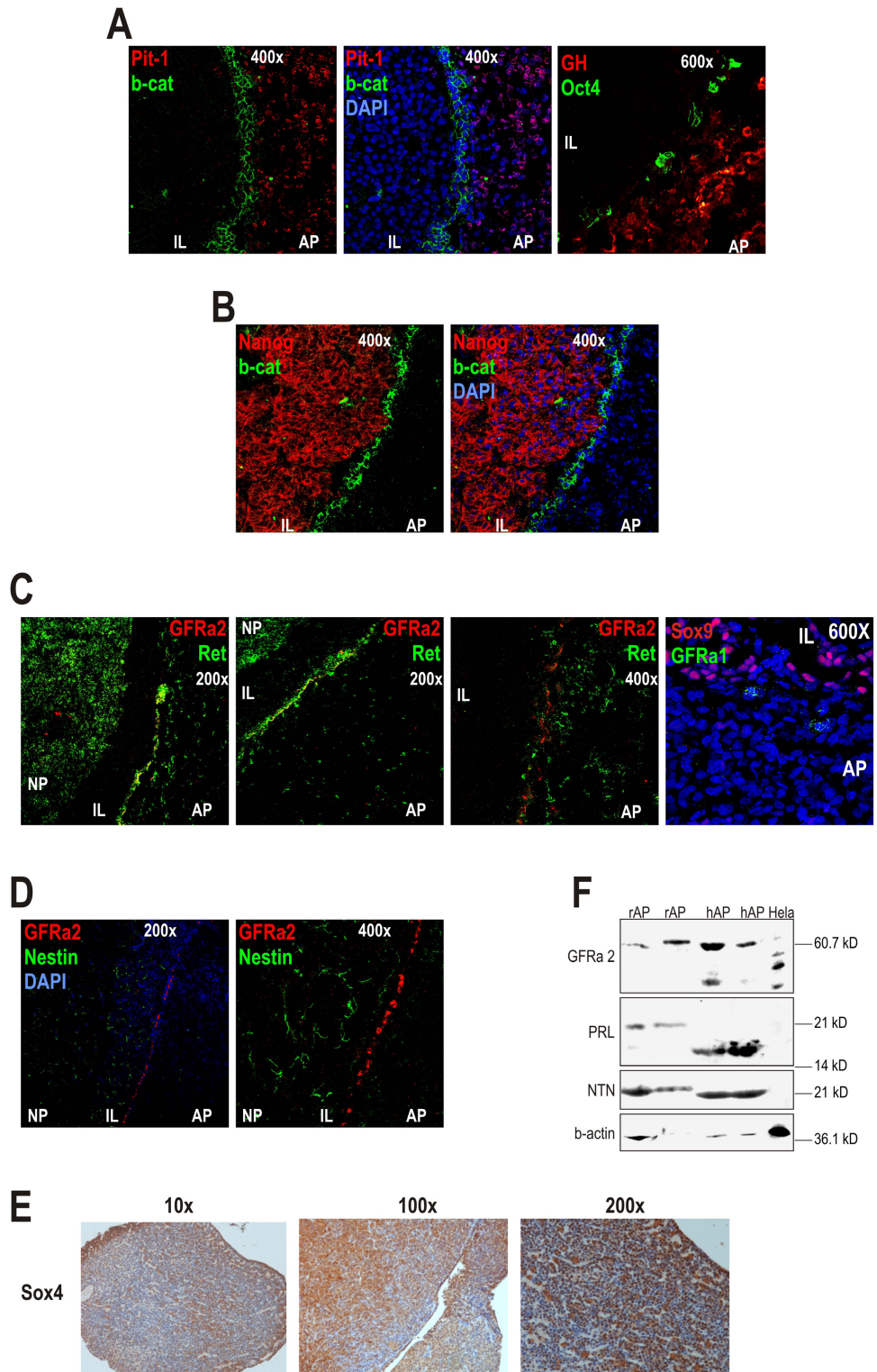
RT-PCR.

Genes	Forward (F) and Reverse (R) Primers.	Fragment (bp)
GRFa2	F-5' TTCAGGCTCGCTTCAATCTT 3' R-5' AACTGCAAGAAGCTTCGCTC 3'	122
Oct4	F-5' CAAGTTGGCGTGGAGACTCTGC 3' R-5' AGACAACCATCTGCCGCTTCG 3'	299
Prop1	F-5' GACAGCTGGAGTCAGCCTTT 3' R-5' GCAAGAGCGGTCACTACTCC 3'	153
GH	F-5' GCAGAGAACTGACATGGAATTG 3' R-5' GATGACGCTCTGCTCAAAA 3'	269
Ret	F-5' CATCAAGTTGTACGGGGCTT 3' R-5' TGCCTCCACTGCTCACATAG 3'	134
Pit1	F-5' TTCCAGACCACACCCTGAGT 3' R-5' ACTTTTCCGCTGAGTTCCT 3'	190
Hprt	F-5' CAGTCCCAGCGTCGTATT 3' R-5' AGCAAGTCTTTTCAGTCCTGTC 3'	139

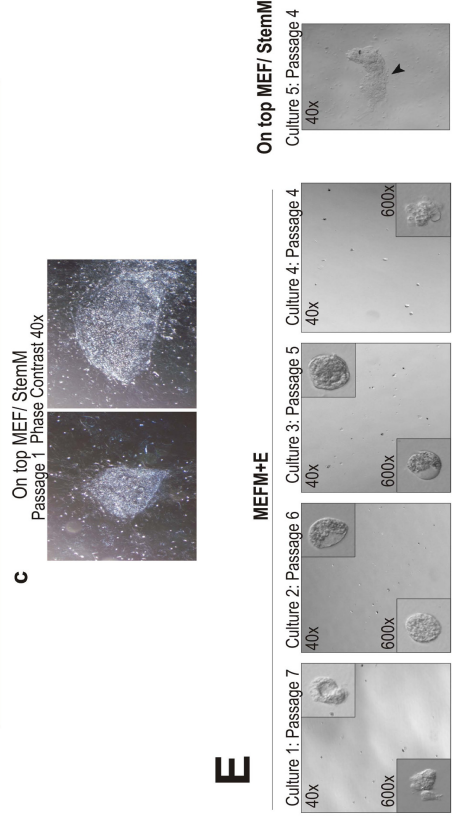
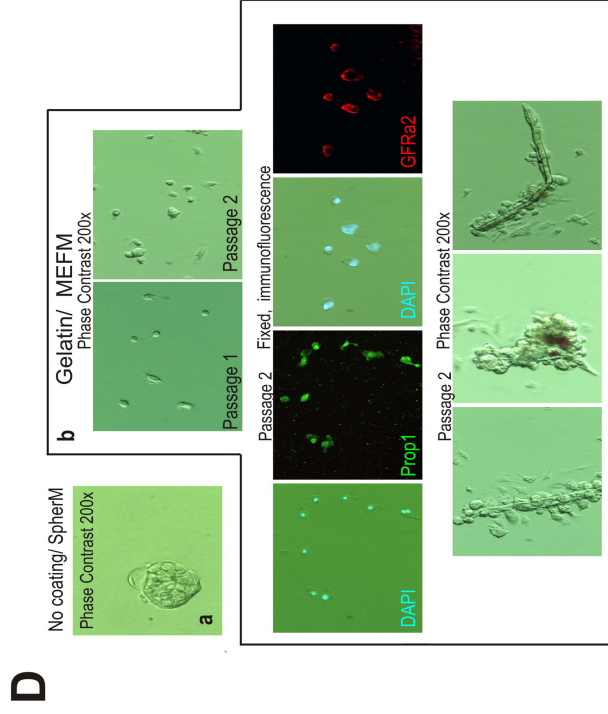
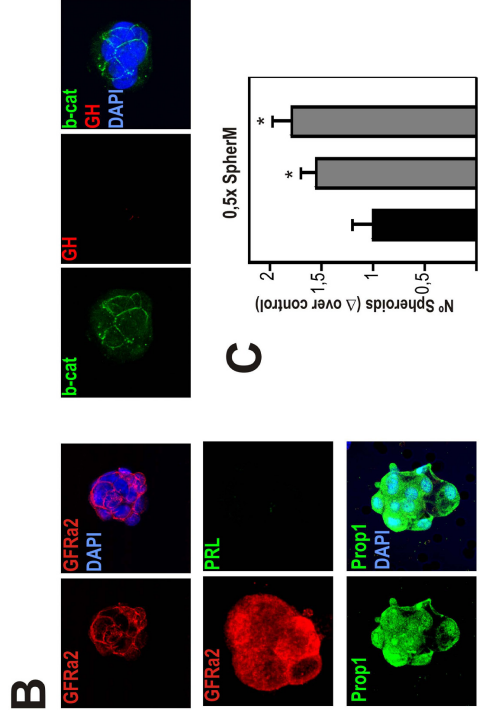
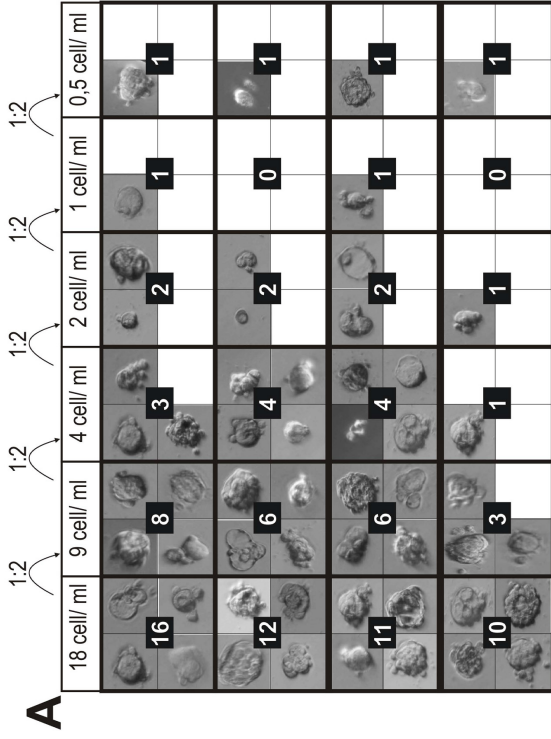


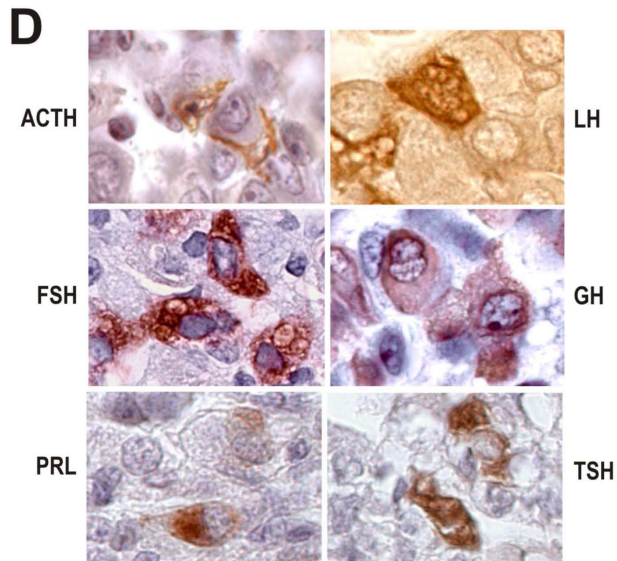
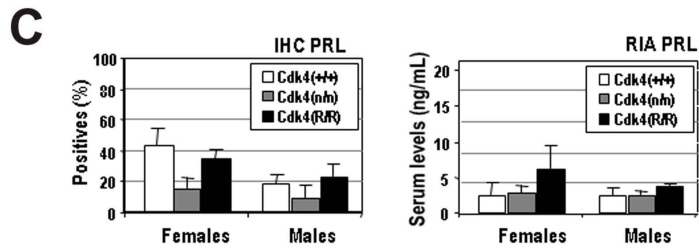
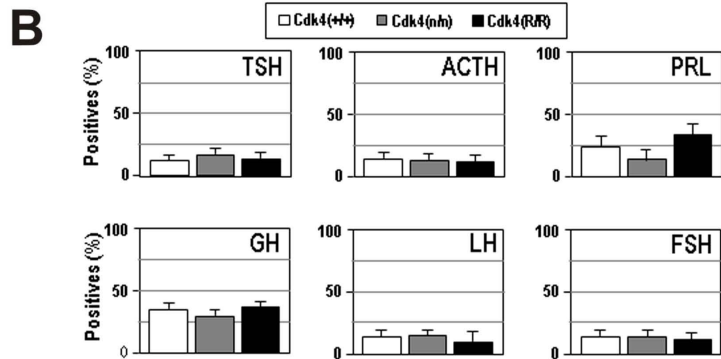
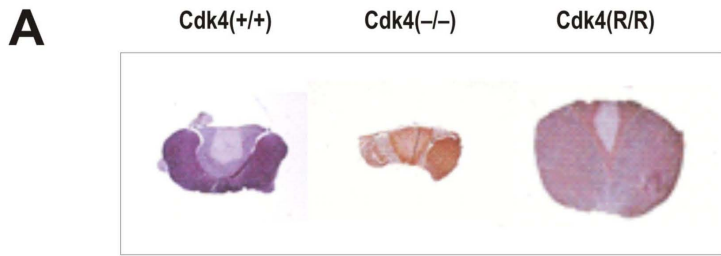
Pituitary 10 days

Supplementary Fig 1



Supplementary Figure 2





Supplementary Figure 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 339 911**

② Número de solicitud: 200803351

⑤ Int. Cl.:
C12N 5/04 (2010.01)
A61K 35/55 (2006.01)
A61P 5/06 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **25.11.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
26.05.2010

⑦ Solicitante/s:
Universidad de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES
Fundación Centro Nacional de Investigaciones
Oncológicas Carlos III

⑧ Inventor/es: **Álvarez Villamarín, Clara;**
Diéguez González, Carlos;
García Lavandeira, Montserrat y
Malumbres, Marcos

⑨ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

⑮ Título: **Aislamiento de células hipofisarias multipotentes y diferenciación *in vitro* de las mismas.**

⑯ Resumen:

Aislamiento de células hipofisarias multipotentes y diferenciación *in vitro* de las mismas. El procedimiento de la invención se basa en la presencia en las células hipofisarias multipotentes de un receptor de la cara exterior de la membrana, GFRa2+, que no presentan otras células de la hipófisis. El procedimiento de aislamiento utiliza anticuerpos dirigidos contra ese receptor y técnicas que permiten la separación de las células a las que se hayan unido dichos anticuerpos. Una vez aisladas, las células pueden mantenerse en cultivo sin diferenciarse o puede provocarse su diferenciación, para dar lugar a células productoras de hormonas hipofisarias o a células con fenotipo de neuronas. Así, las células aisladas por el procedimiento de la invención pueden utilizarse para la producción de hormonas hipofisarias. El uso de anticuerpos dirigidos contra GFRa2+, acoplados a moléculas señalizadoras, permite también la identificación de la presencia de las células hipofisarias multipotentes en cualquier muestra.

ES 2 339 911 A1