



El paper del factor de transcripció Math6 en la diferenciació pancreàtica

Miriam Ejarque Carbó

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

EL PAPER DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ MATH6 EN LA DIFERENCIACIÓ PANCREÀTICA

Tesi doctoral presentada per

Miriam Ejarque Carbó

Per optar al títol de

Doctora per la Universitat de Barcelona



Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la doctora Rosa M Gasa en el Laboratori de Diabetis i Obesitat de l'IDIBAPS

Dra. Rosa M Gasa Arnaldich

Miriam Ejarque Carbó

Barcelona, Setembre 2012

***"La naturalesa ha brindat al nostre esperit
d'una set insaciable de veritat"***

AGRAÏMENTS

S'acaba una etapa i és hora d'estendre les ales per continuar el camí, però no sense abans deixar constància de tota la gent que ha estat al meu costat durant aquest temps i d'alguna manera ha format part d'aquest petit tros de la història de la meua vida dins el laboratori de Diabetis i Obesitat. Gràcies Ramon i Anna!

Primer tot a Rosa, epicentre de tots aquests anys, gran científica la qual admiro i admiraré, per l'amor que li té al ofici i la passió que transmet a fer les coses. Perfeccionista, treballadora, en definitiva una gran professional de la qual he après no molt, sinó moltíssim, i que espero algun dia poder transmetre tal i com fa ella el gran entusiasme que té per aquesta ciència que tant ens captiva. Gràcies per deixar-me venir al teu grup i ensenyar-me tantes coses.

En segon lloc a la meua estimadíssima compi Gemma, els nostres camins es van creuar a l'atzar i la veritat que teníem més coses en comú del que pensàvem, però les nostres diferències potser ha estat el que més ens ha fet portar-mos tant bé. Separar-nos quan tu ja et vas fer gran i vas tallar el cordó umbilical va ser dur, encara més quan jo vaig "plegar", i ara ens quedarà el skype jeje hem viscut tantes coses juntes! Un plaer que et creuessin en la meua vida i espero que per sempre! Visca la núvia!

A Lúcia, la miss cuinetes del laboratori, la que ho sap fer de tot i que fa mil i una històries per optimitzar el procés i no perdre el temps en res, la reina de les etiquetes, en definitiva de l'ordre i que va fer de mi una personeta un poc més organitzada ;) l'esforç va merèixer la pena jeje

A Sara, que tot i venir més tard, va ser un reforç més que necessari a les entranyes del nostre petit grup. M'has donat un punt més crític sempre de les coses, i m'has fet vore que les manies existeixen per alguna raó, vals moltíssim i espero que finalment trobis el lloc que veritablement mereixes.

Als tres tècnics que ens queden, els veterans, els que sempre estan allí quan els necessites. Sou un pilar fonamental dins dels respectius projectes de cadascú. Ainhoa, Yaiza, Carlos, mil gràcies! I per suposat, no me em puc deixar a l'altra veterana del grup, la nostra estimada labma, té fet mil i una preguntes Marta i sempre he obtingut un somriure.

Als que ja no estan però sempre recordaré, els que sempre hem van ajudar i escoltar, els quals han acabat i vam reemprendre el camí que jo faré ara, així que sempre seran persones de referència perquè sempre aniran per davant de mi en moltes coses i no només en l'edat ;p Jordi, Esther, Marta, va per a vatos!

Als que van venir més tard i encara els hi queda una temporada pel laboratori, el relleu generacional en aquest món de bojós de la ciència, que m'han fet el camí d'allò més divertit. Anirem per ordre

d'arribada, espero que no em falli la memòria. Així que primer et toca a tu Montse, noia de poques paraules però contundents, només dir-te que com seré la teua predecessora ja saps on sóc sempre que hem necessitat que a Estrasburg segur que la gent no és tant animada i m'avorriré mooolt. A les portugueses, Joana i Lisa, però en especial a aquesta última que és amb qui he compartit més a l'hora de cafè, gimnàs, menjador, etc. Espero que ara que no et tindrè en mi m'expliques més coses per email o algo perquè sinó tu no sueltas prenda! A Fabian, el primer xileno que he conegut i que ha deixat tanta huella! Difícil d'oblidar, alegre, dixaraxero, per a qui el coneix no fan falta més qualificatius. A Katerina que casi casi està a punt de llegir com jo, bona sort! A l'Alba, més que una companya, que dins dels teus dubtes existencials sempre has tirat per l'opció de tirar endavant, i que ja saps que espero tenir-te sempre ben prop meu. Al yogurín del grup, al noi alegre i fiestero del grup, el que mai té un no per resposta, Marc, el sensei et diu que pensis més en tu i recorda'm quan siguis un tio ric i en negocis per contractar-me ;) A la Marta que al final has pogut trobar el teu forat al món, i jo hi era present. A la cuqui de l'Alba, nena jo de gran vull ser com tu, desparpajo en estat pur. I a l'altra cuqui, la Valeria, la italiana de pura cepa que no deixa indiferents, siempre dando amor!

Ara toca als post-docs, primer a la Sandra, gran cuinera i científica, gràcies a tu he descobert una nova dimensió de postres mmmm... a Maud, que vas deixar un forat difícil de tapar al grup de les novials i a la resta de nosaltres. A Nathalie, Paola, Rebeca cadascuna d'un país aportant sabor propi al grup. Als que he tingut menys temps per conèixer però no per això menys importants, Rita, Helena, Edu, Elaine, Lucia, Laura i en especial a Gema, pinya grup menjador!

Als IPs del laboratori, a Marce primer de tot perquè li ha tocat suportar les comissions de seguiment i les ha passat sense existir (casi). Al Joan Marc per les seues catalanades que ens arranquen sempre un somriure en el moment menys pensat, espero que no preguntis massa el dia de la tesi, ja tremolo! Al Marc Claret per donar-mos sempre una visió crítica de la situació i ser un gran professional. I per últim als mes joves d'aquest grup, Pablo i Carles, bona sort!

A les super companyes de la universitat, amb les quals vaig començar aquest camí cap a la ciència i investigació, però algunes d'elles es van pervertir i van passar a altres mons més ben pagats, de vosaltres també espero una recomanació per trobar un treball al món de l'indústria farmacèutica. Vau començar a formar part de la meua vida ja fa molt de temps i espero poder compartir molts més moments importants de la meua vida. Als amics de Tortosa, Penya Aspardenyà, Reines i alguns altres despirgolats però que se que sempre que us necessito us tinc allí. Sense vosaltres tot això no hagués estat el mateix.

A la meua família, primer de tot els meus pares els quals s'han esforçat dia a dia per donar-me tot el que necessitava i més i donar-me uns valors que m'han fet tal i com sóc avui. Tan debò pugui jo fer el mateix amb els meus futurs fills, un exemple d'esforç i dedicació, no puc demanar res més. Als meus avis, sobretot Julio i Olegario que si haguessin pogut estar avui aquí estarien orgullosos de veure com la seva neta poc a poc es va fent gran. A les meves dues tietes i respectius tiets, cosí, cosines, fillola que fan que estigui més que orgullosa de la família que formem, un exemple a seguir.

A la meua germana gran, que ha fet de la meua vida un camí de roses, sempre preocupant-se per mi, donant-ho tot. Com les branques d'un arbre, creixem en diferents direccions però les nostres arrels continuen sent una sola, la vida de cadascuna serà sempre una part essencial de l'altra. I al meu cunyat, el calleja de la família, gràcies per estar allà els dos sempre que us necessito.

A la futura família Alado, per estar allí i parir un fill excel·lent! Enric, amic, company, compinche, novio, marit? Jeje Cada dia em sento més afortunada de tenir-te al meu costat. El final d'aquesta etapa significa un inici dur d'un altra per nosaltres, però estic més que segura que tot sortirà perfecte, sin tí no soy nada, així que no puc viure un somni en plenitud sense tu. Al teu costat cada instant del dia és un gran moment per a la meua vida.

A TOTS MIL GRÀCIES!

ÍNDEX

ÍNDEX	1
ABREVIACIONS	9
I.INTRODUCCIÓ	15
1. HOMEÒSTASI DE LA GLUCOSA	17
1.1. El pàncrees	18
1.2. Les cèl·lules endocrines	19
1.3. La <i>Diabetis Mellitus</i>	21
1.3.1. Diabetis tipus I	21
1.3.2. Diabetis tipus II	22
1.3.3. Altres tipus de diabetis	22
1.3.4. Epidemiologia	23
1.4. Tipus de teràpies per al tractament de la diabetis.....	23
2. ONTOGÈNIA DE LA CÈL·LULA b	27
2.1. Orígenes embrionaris	27
2.2. Morfogènesi pancreàtica	27
2.3. Xarxa transcripcional durant el desenvolupament pancreàtic.....	29
2.3.1. Factors de transcripció implicats en el desenvolupament primerenc del pàncrees.....	30
2.3.2. Factors de transcripció implicats en la inducció del compartiment endocrí	36
2.3.3. Factors implicats en la determinació dels diferents subtipus cel·lulars endocrins.....	37
2.4. Importància de les senyals extracel·lulars en el desenvolupament pancreàtic	39
3. FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ bHLH I PÀNCREES	43
3.1. Visió general de la superfamília bHLH	43
3.2. Neurogenina3.....	45
3.3. NeuroD1	47
3.4. Math6	48
3.4.1. Descripció.....	48
3.4.1. Math6 i pàncrees	50
4. CICLE CEL·LULAR I DESENVOLUPAMENT PANCREÀTIC	53
4.1. El cicle cel·lular	53
4.1.1. Fases del cicle cel·lular	53
4.1.2. Control del cicle cel·lular	55
4.1.3. Mecanismes de vigilància del cicle cel·lular	59
4.2. Regulació del cicle cel·lular durant el desenvolupament	60

4.2.1.Coordinació de la sortida de cicle amb la diferenciació terminal	60
4.2.2.Proteïnes del cicle cel·lular en el desenvolupament pancreàtic	61
4.2.3.Manteniment de la sortida de cicle: canvis a nivell de cromatina	64
II.OBJECTIUS.....	67
III.MATERIALS I MÈTODES	71
1. LÍNIES CEL·LULARS	73
1.1.Manteniment de les línies cel·lulars.....	73
1.1.1.Tripsinització i comptatge	73
1.1.2.Criopreservació de cèl·lules	73
1.1.3.Descongelació de cèl·lules	73
1.2.Assajos dual de luciferasa	74
1.2.1.Transfeccions transitòries	74
1.2.2.Determinació de l'activitat luciferasa	75
1.3.Proliferació cel·lular	75
1.4.Estudis de la distribució cel·lular en les diferents fases del cicle	75
1.4.1.Tinció amb iodur de propidi i citometria de flux.....	75
1.4.2.Tinció amb Ph3 i citometria de flux	76
2. VECTORS D'EXPRESSIONÍ	77
2.1.Generació vectors d'expressió	77
2.1.1.Amplificació per a la clonació de gens	77
2.1.2.Clonació de fragments de PCR	77
2.1.3.Digestió de vectors.....	78
2.1.4Separació de trànscrips en agarosa	78
2.1.5Purificació de bandes.....	79
2.1.6.Lligació de fragments	80
2.1.7.Transformació de bacteris competents	80
2.1.8.Amplificació (creixement de bacteris en medi líquid).....	81
2.1.9.Purificació de plasmidis bacterians.....	81
2.1.10.Amplificació per a seqüenciació.....	82
2.2.Vectors d'expressió creats	83
2.2.1.PM2-Math6 i els diferents constructes.....	83
2.2.2.PM3-E47.....	83
2.2.3.PM3-Neurog3.....	83

2.2.4.pCMVTnt-Math6 1-232aa i PAC.CMV-Math6 1-232aa	83
2.2.5.pCMVTnt-Math6 Dbasic i PAC.CMV-Math6 Dbasic	83
3. ADENOVIRUS RECOMBINANTS	84
3.1.Generació de l'adenovirus Ad.CMV-Math6 1-232aa i ad.CMV-Math6 Dbasic	84
3.2.Amplificació d'adenovirus recombinants	85
3.3.Aïllament de DNA víric	85
3.4.Titulació d'adenovirus recombinants	85
3.5.Infecció amb adenovirus recombinants	87
3.5.1.Infecció amb dos adenovirus	87
4. RNA I DETERMINACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA	88
4.1.Extracció de RNA	88
4.1.1.Mètode de purificació per columnes (RNeasy mini i micro kit)	88
4.2.Quantificació del RNA i determinació de la seva integritat.....	89
4.2.1.Determinació de la integritat del RNA per electroforesi en gel d'agarosa desnaturalitzant	89
4.2.2.Determinació de la seva integritat per bioanalyzer	90
4.3.Retrotranscripció de RNA a cDNA	90
4.3.1.Protocol superscript III	90
4.4.PCR a temps real i anàlisi de l'expressió gènica	91
4.4.1.Validació encebadors	92
5. PROTEÏNES	93
5.1.Extracció de proteïnes.....	93
5.1.1.Extracció de proteïnes totals de cultius cel·lulars.....	93
5.1.1.Extracció i separació de proteïnes citoplasmàtiques i nuclears de cultius cel·lulars	93
5.2.Quantificació de proteïnes	94
5.3.Detecció de proteïnes	94
5.3.1.Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE)	94
5.3.2.Transferència humida de proteïnes	95
5.3.3.Bloqueig de la membrana de PVDF.....	96
5.3.4.Immunodetecció de proteïnes.....	96
5.3.5.Eliminació dels anticossos (stripping)	97
5.3.6.Immunoprecipitació (IP)	97
5.3.7.Immunohistoquímica	98
6. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (CHIP)	104

6.1. Anàlisi de les dades	107
7. MICROSCOPIA I MUNTATGE D'IMATGES DE MORFOMETRIA	107
8. MODELS ANIMALS	108
8.1. Genotipatge.....	108
8.1.1. Extracció de DNA genòmic.....	108
8.1.2. Amplificació de DNA (PCR convencional).....	109
8.2. Determinació de glicèmia i pes pancreàtic d'animals P1	109
8.3. Test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (IPGTT).....	112
8.4. Aïllament d'illots de ratolí adult.....	110
8.5. Estudis de secreció d'insulina en illots	111
8.6. Determinació del contingut d'insulina en illots.....	110
8.7. Determinació de la concentració d'insulina (ELISA)	110
9. ANÀLISI BIOINFORMÀTIC: MICROARRAYS D'AFFYMETRIX	108
9.1. Microarrays	109
9.2. Control de qualitat i normalització de les dades del microarray.....	109
9.3. Classificació funcional dels gens diferencialment expressats.....	112
10. ESTADÍSTICA	108
IV. RESULTATS.....	117
1. CARACTERITZACIÓ DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DE MATH6	119
1.1. Capacitat de transactivació de caixes E canòniques	120
1.2. Caracterització dels dominis funcionals de Math6.....	123
1.2.1. Construcció de proteïnes de fusió Gal4DBD-Math6	123
1.2.2. Activitat dels constructes Gal4-Math6.....	124
1.2.3. Activitat dels Gal4-Math6 en presència d'altres factors bHLH	126
1.3. Efectes inhibitoris independents a la metilació o deacetilació	121
2. IDENTIFICACIÓ DELS GENS DIANA DE MATH6 EN EL MODEL CEL·LULAR DE DIFERENCIACIÓ	129
2.1. Model de sobreexpressió gènica de Math6	131
2.1.1. Sobreexpressió de Math6	132
2.1.2. Sobreexpressió combinada de Math6 i Neurog3.....	132
2.1.3. Importància del domini bHLH de Math6 en la repressió de gens diana de Neurog3	134
2.1.4. Dinàmica d'activació dels gens diana de Neurog3 reprimits per Math6	135
2.1.5. Seqüències reguladores comunes.....	137
2.2. Model de silenciament gènic de Math6	138
2.2.1. Efectes de shMath6 sobre l'activació de gens endocrins en resposta a Neurog3	138

2.2.2. Microarrays d'expressió.....	140
2.2.3. Classificació funcional dels gens modificats significativament per shMath6.....	141
3. MATH6 I EL CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR.....	143
3.1. Math6 i la proliferació cel·lular	143
3.2. El silenciament de Math6 i la progressió del cicle cel·lular	144
3.3. Efecte de shMath6 sobre el complex ciclinab1/cdk1	145
3.4. Canvis d'expressió de gens reguladors del complex ciclinab1/cdk1	148
3.5. Unió de Math6 als promotors de gens de cicle.....	149
3.6. Proliferació de les cèl·lules Math6-GFP positives <i>in vivo</i>	150
4. CARACTERITZACIÓ DEL FENOTIP PANCREÀTIC DEL MODEL MURÍ GEN ANUL·LAT DE MATH6	152
4.1. Generació i comprovació del model.....	152
4.1.1. Ratolins Math6 fl/fl	152
4.1.2. Ratolins transgènics Pdx1-Cre.....	153
4.1.3. Recombinació.....	153
4.1.4. Comprovació de l'expressió a e14.5 i e15.5.....	155
4.2. Caracterització dels ratolins KO al naixement (P1)	155
4.2.1. Estudi macroscòpic del pàncreas d'animals P1.....	155
4.2.2. Anàlisi morfològic del pàncreas d'animals P1.....	156
4.3. Caracterització dels animals KO en l'adultesa.....	158
4.3.1. Homeòstasi de la glucosa (IPGTT)	158
4.3.2. Estudi macroscòpic del pàncreas d'animals KO de 36 setmanes.....	161
4.3.3. Estudi de la capacitat secretora d'insulina dels illots a alta i baixa glucosa.....	162
4.3.4. Estudi de l'expressió gènica dels illots pancreàtics.....	163
4.4. Caracterització pancreàtica dels animals KO durant el desenvolupament embrionari	163
4.4.1. Anàlisi morfològic d'animals a e15.5	164
4.4.2. Estudi de l'expressió gènica pancreàtica a e14.5 o e15.5.....	165
4.4.3. Nombre de progenitors endocrins.....	168
4.5. Anàlisi de la proliferació del pàncreas en desenvolupament.....	168
V. DISCUSSIÓ.....	171
VI. CONCLUSIONS.....	187
VII. BIBLIOGRAFIA	191
ANNEX	205

ABREVIACIONES

Actb	→ Actina
Amy	→ Amilasa
APS	→ Amonium persulfate (persulfat d'amoni)
Arx	→ Aristaless related homeobox
ATP	→ Adenosina trifosfat
β-Gal	→ β -galactosidasa
bHLH	→ Basic helix-loop-helix
BMP	→ Proteïna morfogènica òsea
BrdU	→ Bromodeoxiuridina
BSA	→ Bovine Serum Albumine (Albúmina de sèrum boví)
CBD	→ Ducte biliar comú
Ccnb1	→ Ciclina B1
Cdk1	→ Cinasa depenent de ciclina 1
cDNA	→ Àcid desoxirribonucleic complementari
CKIs	→ Inhibidors de les Cdk
CoIP	→ Co-immunoprecipitació
Ct	→ Cycle threshold (cicle llindar)
DMEM	→ Dulbecco's modified eagle medium (medi d'àguila modificat per Dulbecco)
DMSO	→ Dimetil sulfòxid
DNA	→ Àcid desoxirribonucleic
DNasa	→ Deoxirribonucleasa
dNTP	→ Deoxyribonucleotide triphosphate (deoxinucleòtids trifosfats)
dp	→ Pàncrees dorsal
DPBS	→ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (solució salina tamponada de fosfats de Dulbecco)
DTT	→ Ditiotreitòl
ECL	→ Enhanced chemiluminescence (quimioluminiscència augmentada)
EDTA	→ Àcid Etilen-Diamino-Tetraacètic
ELISA	→ Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay (assaig per immunoabsorció lligat a enzims)
FBS	→ Fetal Bovine Serum (Sèrum boví fetal)
Fgf	→ Fibroblast Growth Factor (factor de creixement fibroblàstic)
Glc	→ Glucagó
Gck	→ Glucocinasa
GSIS	→ Secreció d'insulina estimulada per glucosa
HBSS	→ Hank's Balanced Salt Solution (Solució equilibrada de salts de Hank)
HDAC	→ Histona deacetilases
HEK293	→ Human epithelial kidney-293 (cèl·lules epitelials de ronyó humà-293)
Hes1	→ Hairy and enhancer of split 1
Hh	→ Hedgehog
Hlxb9	→ Homeobox protein HB9
HNF1a	→ Hepatocyte nuclear factor 1a
HNF4a	→ Hepatocyte nuclear factor 4a
HNF4b	→ Hepatocyte nuclear factor 4b

HRP	→ Horseradish peroxidase (peroxidasa de rabe picant)
IAPP	→ Polipèptid amiloide dels illots
IgG	→ Immunoglobulina de tipus G
Ins	→ Insulina
IPGTT	→ Intraperitoneal glucose tolerance test (test de tolerència a la glucosa intraperitoneal)
IPTG	→ Isopropil β -D-1 tiogalactopiranosid
Kb	→ Kilobases
KO	→ Knock-out (gen-anul·lat)
LB	→ Lysogeny broth (caldo de lisogènia)
Math6	→ Mouse athonal homolog 6
MetOH	→ Metanol
MgCl₂	→ Clorur de magnesi
mGUS	→ Mouse glucuronidase
MODY	→ Maturity-onset diabetes of the young (diabetis de comportament adult que es presenta en joves)
MOI	→ Multiplicity of infection
MOPS	→ 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
mPAC	→ Murine AdenoPancreatic Carcinoma (cèl·lules d'un adenocarcinoma pancreàtic de ratolí)
NaCl	→ Clorur Sòdic
NaF	→ Sodium Flouride (Fluorur de sodi)
NaHCO₃	→ Carbonat sòdic
NaOH	→ Hidròxid sòdic
Neurod1	→ Neurogenic differentiation factor 1
Neurog3	→ Neurogenin3
NFDM	→ Non-Fat Dried Milk
NIH3T3	→ Mouse embryonic fibroblast (fibroblasts embrionaris de ratolí)
Nkx2.2	→ NK2 transcription factor related, locus 2
Nkx6.1	→ NK6 homeobox 1
NP-40	→ Nonidet P-40
Pax4	→ paired box gene 4
Pb	→ Parells de bases
pCMV	→ Promotor de citomegalovirus
PCR	→ Polymerase Chain Reaction (reacció en cadena de la polimerasa)
Pdx1	→ Pancreatic and duodenal homeobox 1
PFA	→ Paraformaldehide
PFU	→ Plate Forming Units
Ph3	→ Histona 3 fosforilada
PP	→ Polipèptid pancreàtic
PPM	→ Progenitors pancreàtics multipotents
Ptf1a	→ Pancreas-specific transcription factor 1
PVDF	→ Polyvinilidene fluoride (flurorur de polividè)
RNA	→ Àcid ribonucleic
RNasa	→ Ribonucleasa
SDS	→ Sodium Dodecil Sulfate (Dodecil sulfat sòdic)
SDS program	→ Sequence detection system (sistema de detecció de seqüències)

SDS-PAGE →	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (electroforesi en gel de poliacrilamida amb Dodecil sulfat sòdic)
Sem →	Standard Error Mean (mitjana de l'error estàndard)
shRNA →	Short hairpin RNA (RNA de llaç curt)
siRNA →	Small interference RNA (RNA petit d'interferència)
Sox9 →	SRY-box containing gene 9
Sst →	Somatostatina
TAE →	Tris, acètic, EDTA
Tbp →	Tata-Box binding protein
TBS →	Tris Buffered Saline (Tampó salí de Tris)
TBS-T →	Tampó salí de Tris amb tween
TCID50 →	50% tissue culture infective dose (50% dosi infectiva en cultiu cel·lular)
TEMED →	N, N, N', N'- tetrametiletildiamida
Tgf-β →	Transforming Growth Factor beta (factor de creixement transformant beta)
UV →	Llum ultraviolada
vp →	Pàncrees ventral
Wnt →	Wingless

I. INTRODUCCIÓ

1. HOMEÒSTASI DE LA GLUCOSA

L'ésser humà té una necessitat constant d'energia però menja de forma intermitent. Per fer front aquest problema, habitualment ingerim més aliments dels necessaris fins cobrir les necessitats calòriques immediates dels nostres òrgans vitals i emmagatzemem les calories extres en forma de glicogen hepàtic i muscular, triglicèrids en el teixit adipós i en menor grau proteïnes tissulars. D'aquesta manera, durant el dejú o en resposta a agressions externes, utilitzem aquests reservoris amb la finalitat de proporcionar l'energia per al metabolisme i la funció dels òrgans.

Els reservoris d'energia en l'ésser humà es formen i es degraden en resposta a missatgers hormonals. El principal missatger és la **insulina**. En un estat postprandial augmenten les concentracions d'insulina, afavorint la síntesi de glicogen en fetge i múscul, la formació de lípids en els adipòcits i la captació d'aminoàcids i la síntesi de proteïnes en la major part de les cèl·lules. En un estat preabsortiu, durant el dejuni o en resposta a agressions, la disminució de la concentració d'insulina contribueix a la degradació de glicogen, la lipòlisis, la cetogènesi hepàtica i la disminució de la síntesi i l'augment de la degradació de proteïnes. En aquest tipus de situacions, una funció primordial de la insulina és actuar com a fre davant aquests esdeveniments catabòlics.

Múltiples hormones contraresten els efectes de la insulina. El glucagó estimula la glicogenòlisi, la gluconeogènesi i la cetogènesi del fetge. Les catecolamines exerceixen efectes similars als del glucagó en el fetge i són reguladores fonamentals de la lipòlisi en el teixit adipós i de la glicogenòlisi en el múscul i altres teixits. En general, les hormones contra-insulina o contra-reguladores, alliberen energia dels dipòsits mitjançant accions oposades a les de la insulina. Encara que l'homeòstasi de l'energia ha estat concebuda clàssicament en el context de la seva regulació per les hormones, també les variacions del propis elements energètics poden exercir una funció directa.

Un objectiu principal de la relació entre insulina i les hormones contra-reguladores en l'ésser humà és el manteniment de la **normoglicèmia**. La concentració de glucosa en la circulació està controlada de forma molt més fina que la de qualsevol altre element energètic. Les concentracions de glucosa en plasma es mantenen entre 4 i 7 mM (70-120 mg/dL) en un ésser sà, a pesar de les variables taxes d'utilització de glucosa.

1.1. El pàncrees

El **pàncrees** és una glàndula lobulada essencial i responsable de la digestió i la homeòstasi de la glucosa. També representa la única font productora d'insulina, la seva alteració ocasiona problemes de salut molt importants.

Aquest consta principalment de cèl·lules exocrines, endocrines i ductals, que juntament amb la irrigació, es coordina per regular l'equilibri nutricional. La **funció exocrina** del pàncrees depèn de les cèl·lules acinars, que secreten enzims digestius i altres element no enzimàtics al duodè. Aquest teixit constitueix aproximadament el 80-85% del total de la massa pancreàtica. Els **illots de Langerhans** s'encarreguen de la **funció endocrina** del pàncrees, i cadascun d'ells treballa com un micro-òrgan. Són agrupacions compactes i esfèriques de cèl·lules disperses al llarg del teixit exocrí més abundant, constitueixen únicament del 2 al 5% de la massa total pancreàtica. Els illots estan constituïts per diferents tipus cel·lulars que secreten hormones al torrent circulatori per regular l'homeòstasi de la glucosa. Per aquest fet, dins els illots penetra un entramat de microvascularització fenestrada i fibres nervioses que contribueixen a administrar aquesta regulació (fig.1).

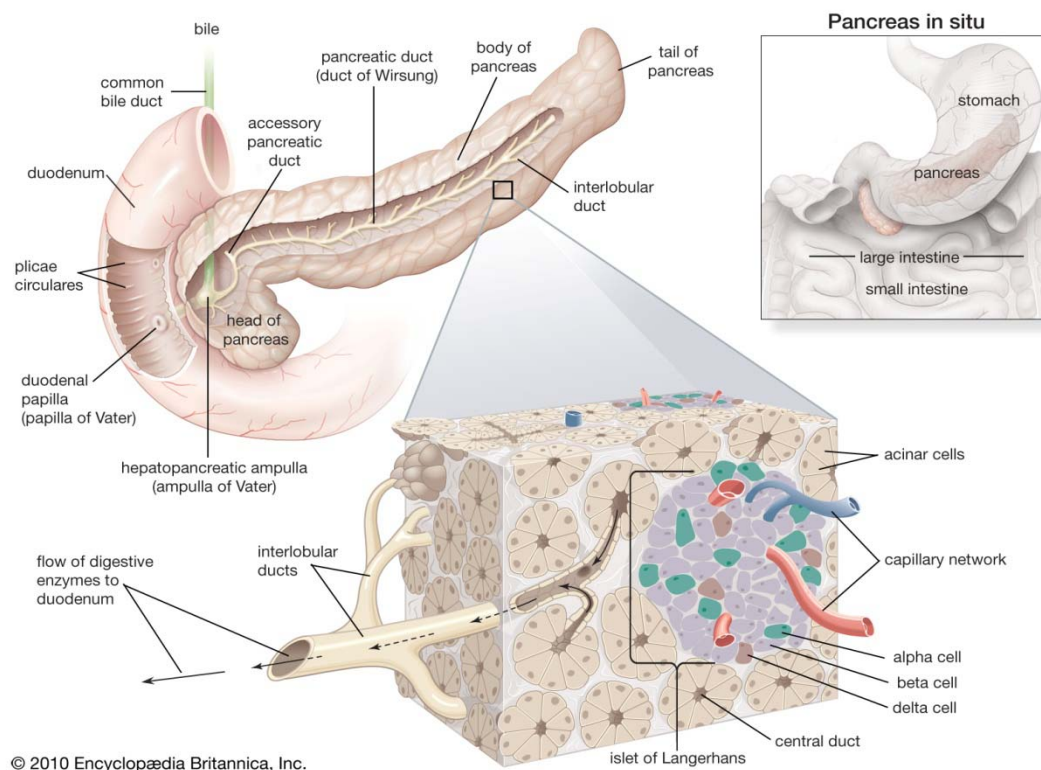


Figura 1. Anatomia del pàncrees adult (Copyright © Encyclopaedia Britannica, Inc.)

1.2. Cèl·lules endocrines

En els illots de Langerhans hi ha 5 tipus principals de cèl·lules endocrines: cèl·lula β productora d'insulina, cèl·lula α productora de **glucagó**, cèl·lula δ productora de **somatostatina**, cèl·lula PP productora de **polipèptid pancreàtic** i cèl·lula ϵ productora de **grelina** (fig.2).

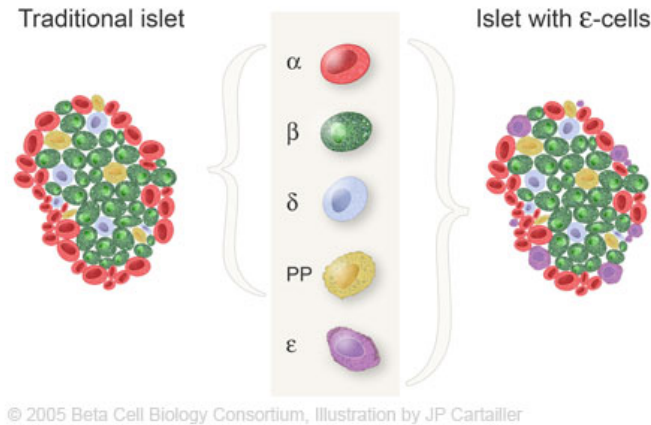


Figura 2. Tipus cel·lulars del illot abans i després de la identificació de les cèl·lules ϵ (Copyright © Beta cell Biology Consortium).

Les **cèl·lules β** són polièdriques i habitualment estan molt granulades, contribueixen en un 60-80% de la massa del illot. Existeixen dues formes de grànuls d'insulina: els grànuls madurs amb un nucli electrodens i una membrana limitant que s'adapta de forma laxa i agafa forma d'halo espaiós, i grànuls immadurs amb un halo escàs o inexistent i un contingut moderadament electrodens. La insulina no és l'únic pèptid dels grànuls, hi ha al menys uns altres 100 pèptids entre els quals destaca l'amilina o IAPP.

Les **cèl·lules α** són habitualment més petites i cilíndriques que les β i molt granulades, són el segon grup més nombrós de cèl·lules en l'illot (20-25%). Les **cèl·lules δ** encara són més petites que les anteriors, estan molt granulades i sovint tenen una forma dendrítica (5-10%). Les **cèl·lules PP** són les més variables entre espècies (10-15%) i les ϵ van ser l'últim tipus cel·lular que va ser descobert (<1%). La distribució de les cèl·lules endocrines no és aleatòria, hi ha un nucli de cèl·lules β rodejades d'un mantell discontinu de cèl·lules no β . Els illots de la majoria d'espècies de mamífers adopten aquest patró, tot i que els éssers humans i altres primats presenten una distribució una mica més complexa, no sempre mantenint aquesta distribució de mantell i nucli (fig.3).

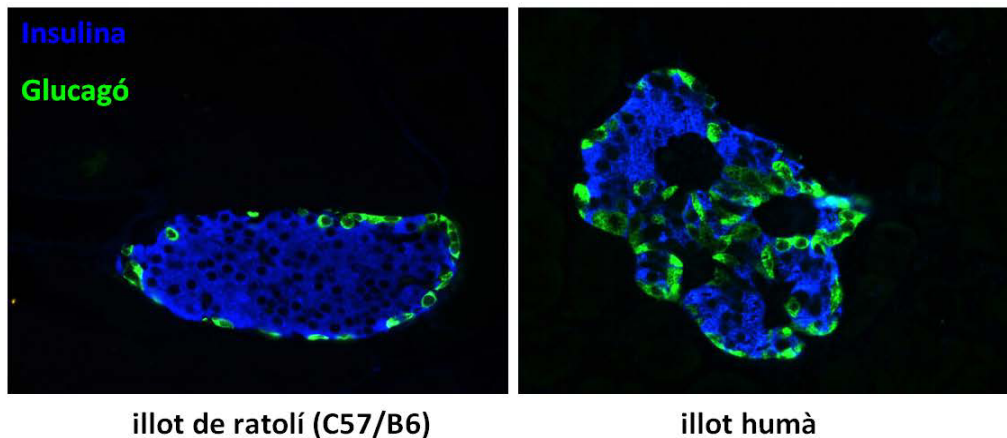


Figura 3. Diferent distribució dels dos tipus majoritaris cel·lulars en illots de ratolí i humà. Fotos a 40x obtingudes en el laboratori.

La massa de l'illot es troba determinada pel nombre de cèl·lules i el seu volum (mida) cel·lular. El nombre de cèl·lules β presents en l'illot al naixement són generades principalment per la proliferació i diferenciació dels progenitors endocrins, el que es coneix com el procés de **neogènesi**. Després del naixement, la neogènesi esdevé un fenomen rar i només un grup reduït de cèl·lules β tenen la capacitat d'expandir-se i cobrir una major demanda d'insulina. Tot i que en l'edat adulta la **replicació** es dona en una proporció molt baixa, es considera el mecanisme més important en la generació de massa de cèl·lula β . La neogènesi en l'edat adulta a partir de precursors de dins o fora de l'illot representa un mecanisme molt més potent a l'hora d'obtenir una expansió més robusta de la massa de cèl·lula β , però aquesta requereix la presència d'estímuls exògens [1].

Encara que existeixen nombrosos estímuls del creixement de les cèl·lules β , es coneixen tres d'importants: prolactina, hormona del creixement i glucosa. Al llarg de la vida, poden produir-se canvis compensatoris en la funció i la massa de la cèl·lula β per satisfer les demandes metabòliques i mantenir la normoglicèmia. La compensació funcional pot obeir a variacions de la sensibilitat de la cèl·lula β degut a modificacions en el llindar de secreció d'insulina induït per glucosa. Així mateix, la massa de les cèl·lules β pot ser dinàmica, amb augments i disminucions, per compensar les demandes canviants com el cas de l'embaràs, obesitat o resistència a la insulina. La regulació de la replicació, neogènesi, apoptosi i grandària cel·lular pot contribuir a aquestes variacions de la massa (fig.4).

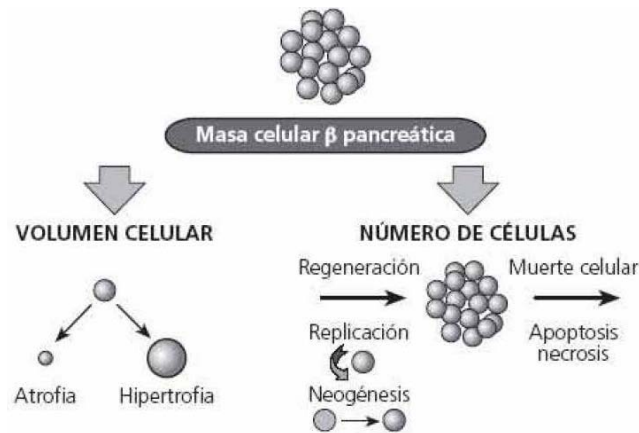


Figura 4. Esquema de l'estat dinàmic de les cèl·lules β . La població de cèl·lules β té un recanvi lent, on la renovació prové de la replicació de les cèl·lules β preexistents i de la neogènesi. La hipertrofia de cèl·lules individuals pot augmentar la massa però no el nombre.

1.3. Diabetes Mellitus

La diabetes és un grup heterogeni de trastorns metabòlics que es caracteritza per hiperglicèmia crònica, acompanyada de l'alteració del metabolisme dels hidrats de carboni, dels greixos i de les proteïnes com a conseqüència del defecte de secreció d'insulina, de l'acció de la insulina o ambdues. Algunes formes de la malaltia es caracteritzen atenent a la seva etiologia o patogènies específiques, però l'etiologia subjacent de les formes més freqüents segueix sent desconeguda. Per a les dues formes més freqüents s'ha adoptat els termes *diabetes tipus I* i *diabetes tipus II*.

1.1.1. Diabetes tipus I

La diabetes tipus I també anomenada "diabetes dependent d'insulina" o "diabetes juvenil", es deu principalment a la destrucció selectiva de les cèl·lules β , que provoca una deficiència absoluta d'insulina. El pàncrees és incapaç de mantenir l'homeòstasi de la glucosa, i això s'agreuja ja que els teixits perifèrics (múscul, teixit adipós) i el fetge no poden metabolitzar la glucosa degut a aquesta mancança d'insulina. El fetge activa la via gluconeogènica i glucogenolítica, fet que agreuja la hiperglicèmia. Els pacients diabètics necessiten obtenir energia d'altres substrats i mobilitzen àcids grassos lliures del teixit adipós al fetge per obtenir energia de la seva posterior oxidació podent arribar a una complicació secundària de conseqüències greus com la cetoacidosi. A més a més, el mal control metabòlic i la hiperglicèmia, produeixen patologies secundàries tardanes responsables de les alteracions oculars, cardiovasculars, circulatòries, renals i neurològiques presents en la diabetes.

La diabetis tipus I apareix en una etapa inicial de la vida, generalment abans dels 30 anys. Tan sols 1 de cada 20 persones diabètiques presenta aquest tipus de diabetis. L'administració d'insulina en aquest tipus de pacients és essencial. La diabetis tipus I es classifica en casos **autoimmunes** (forma més comú) i en casos **idiopàtics**. Quan està mitjançada pel sistema immunitari ens trobem davant una destrucció de les cèl·lules β a través de les pròpies cèl·lules T autorreactives, i amb la presència d'alguns dels marcadors d'immunitat ICAs (Islet Cell Autoantibodies): la isoforma de l'àcid glutàmic descarboxilasa GAD65, i les molècules de la família de proteïnes transmembrana tirosina fosfatasa IA-2, i la IA-2 β . Però aquesta no deu ser la única causa primària, aquesta malaltia també està associada a diferents gens o al·lels de susceptibilitat del complex major d'histocompatibilitat (HLA) [2, 3]. Quan té causes idiopàtiques no hi ha evidències d'autoimmunitat ni associació a HLA, i en aquest cas acostuma a ser hereditària [4].

1.1.2. Diabetis tipus II

Aquest tipus és la forma més freqüent de diabetis. Es caracteritza per trastorns de l'acció i la secreció de la insulina, qualsevol dels dos pot ser la característica predominant. Si bé es desconeix l'etiologia específica d'aquesta forma de diabetis, no hi ha destrucció autoimmune de les cèl·lules β . Els pacients amb diabetis tipus II solen mostrar resistència a la insulina i una insuficiència d'insulina relativa. En el moment del diagnòstic i al llarg de la seva vida, aquest tipus de pacients no necessiten tractament amb insulina per sobreviure, encara que podria requerir-se en fases finals per al control de la glicèmia. Aquesta forma de diabetis s'associa a un fracàs de la cèl·lula β conforme evoluciona la malaltia. El risc de desenvolupar aquest tipus de diabetis augmenta amb l'edat, l'obesitat i la inactivitat física.

1.1.3. Altres tipus de diabetis

Existeixen altres tipus específics de diabetis en els que poden identificar-se defectes o processos subjacents d'una forma relativament específica o que té altres trets distintius o característics, com són alguns tipus de diabetis secundàries a altres afeccions específiques o que s'associen a malalties o síndromes particulars d'etiologia diferenciada (taula 1).

ALTRES TIPUS ESPECÍFICS DE DIABETIS	
Defectes genètics de la funció de la cèl·lula β	Malalties del pàncrees exocrí
Cromosoma 20, HNF4a (MODY1) Cromosoma 7, Glucocinasa (MODY2) Cromosoma 12, HNF1a (MODY3) Cromosoma 13, IPF1 (MODY4) Cromosoma 17, HNF3b (MODY5) Altres	<i>Pancreatitis</i> <i>Neoplàsia</i> <i>Fibrosis quística</i> <i>Síndrome de Wolcott-Rallison</i> <i>Hemocromatosis</i> <i>Altres</i>
Defectes genètics de l'acció de la insulina	Endocrinopaties
Diabetis lipoatròfica Síndrome de Rabson-Mendenhall Altres	<i>Síndrome de Cushing</i> <i>Acromegàlia</i> <i>Glucagonoma</i> <i>Hipertiroïdisme</i> <i>Altres</i>
Altres síndromes genètiques que en ocasions s'associen a diabetis	Induïda per fàrmacs o químics
Síndrome de Down Síndrome de Turner Distròfia miotònica Altres	<i>Glucocorticoides</i> <i>Interferó α</i> <i>Agonistes alfa i beta adrenèrgics</i> <i>Altres</i>
Formes infreqüents de diabetis de mediació immunitària	Infeccions
Síndrome autoimmunitària d'insulina Anticossos front el receptor d'insulina Altres	<i>Citomegalovirus</i> <i>Rubèola congènita</i> <i>Altres</i>

Taula 1. Altres tipus de diabetis classificades en funció de la seva etiologia [5].

1.1.4. Epidemiologia

La diabetis és un greu problema sanitari tant per la prevalença de la malaltia com per les greus complicacions cròniques que desenvolupen els pacients. Les previsions per als pròxims anys són pessimistes ja que s'espera que el nombre de pacients augmenti dels 285 milions del 2010 (el 6,4% de la població mundial adulta) a 438 milions a l'any 2030 (7,8%), el que es considera ja una epidèmia [6].

2.1. Tipus de teràpies per al tractament de la diabetis

Durant els últims anys importants avenços científics han augmentat el nostre coneixement sobre la fisiopatologia de la diabetis tipus I i II, i això ha donat lloc a noves orientacions terapèutiques. Nous coneixements sobre el mecanisme d'acció de la insulina i la resistència a aquesta hormona, major comprensió dels mecanismes que controlen la secreció d'insulina, i avenços en genètica i

immunologia han contribuït a aquesta explosió de coneixement. A més a més, hem d'afegir diversos estudis prospectius aleatoritzats, que demostren els efectes beneficiosos del control estricte de la glicèmia, i la disponibilitat de nous tractaments orals i noves formulacions d'insulina proporcionen una justificació convincent per millorar el nivell global d'assistència en la diabetis [5].

Tot i això, les molèsties que tenen els pacients com un control periòdic de la glicèmia i injeccions repetides d'insulina al llarg del dia, fa moltes vegades extremadament difícil aconseguir la normoglicèmia. Això portarà a la llarga a complicacions micro- i macrovasculars severes, que poden portar a la mort. Cal recordar que les injeccions d'insulina són un tractament pal·liatiu, no una cura.

Les limitacions del tractament actual de la diabetis ha estimulat la cerca de teràpies que permetin restaurar la massa de cèl·lula β per aconseguir arribar de nou a la normoglicèmia. El **transplantament de pàncrees** és en l'actualitat l'únic tractament que aconsegueix restaurar la normoglicèmia a llarg termini, però pot ser ofert tan sols a un nombre limitat de pacients, i encara que la seva mortalitat s'ha reduït considerablement presenta una morbiditat molt important. Alternativament, el **transplantament** cel·lular ja sigui **d'illots pancreàtics** o únicament de cèl·lules productores d'insulina, ofereix nombroses avantatges potencials que el fan especialment atractiu. De totes elles el transplantament d'illots és la única que ha aconseguit pel moment un ús clínic, emprant el protocol d'Edmonton. Amb aquest es va millorar notablement la tècnica, augmentant el nombre d'illots trasplantats i un règim lliure de teràpia immunosupressiva per glucocorticoides que reduïa considerablement la toxicitat de la cèl·lula β tot i que no aconseguia eliminar-la [7]. No obstant, aquesta aproximació està limitada pel fet que amb el temps els pacients sofreixen una reducció gradual en la funció cel·lular, resultant un altre cop en la necessitat d'insulina en la majoria dels subjectes. A més a més, hi ha un nombre molt limitat de donants tenint en compte la gran demanda que existeix i el procés d'extracció d'illots és limitat degut al baix rendiment del procediment, fet que implica la necessitat de més d'un donant per receptor.

Donat que l'obtenció d'illots de donats és un factor limitant en l'aplicació de teràpies basades en el reemplaçament de les cèl·lules β perdudes en pacients diabètics s'ha vist la necessitat d'obtenir altres fonts de cèl·lules productores d'insulina funcionals. D'aquesta manera, s'han proposat diverses estratègies de **medicina regenerativa** per obtenir noves cèl·lules β en funció de tres tipus cel·lulars diferents com a origen: 1) a partir de cèl·lules terminalment diferenciades (com cèl·lules exocrines per exemple - *Transdiferenciació*); 2) a partir de cèl·lules mare multipotents adults (cèl·lules ovals hepàtiques - *Transdeterminació*); 3) a partir de cèl·lules mare pluripotents (Cèl·lules mare embrionàries (ES) o cèl·lules mare pluripotents induïbles (iPSC) - *Diferenciació*) (fig.5) [8].

La investigació actual sobre el desenvolupament inicial del pàncrees pretén aclarir la generació de les cèl·lules pancreàtiques i els mecanismes genètics que expliquen la seva anatomia i fisiologia. La possibilitat de neogènesi d'illots *in vivo* i del transplantament com a possible tractament de la diabetis determina que l'estudi dels fonaments del desenvolupament de la cèl·lula β i la síntesis d'insulina siguin especialment importants. A més a més, la perspectiva d'utilitzar cèl·lules precursors pluripotents per generar un aportació il·limitada de cèl·lules β remarca la necessitat d'entendre la regulació de la generació normal de cèl·lules endocrines en l'embrió. Encara que s'ha fet un gran progrés en esbrinar els fonaments del desenvolupament, encara queda molt per entendre sobre la regulació de les vies de senyalització i factors de transcripció que guien la especificació pancreàtica, la diferenciació endocrina i la seva maduració [9].

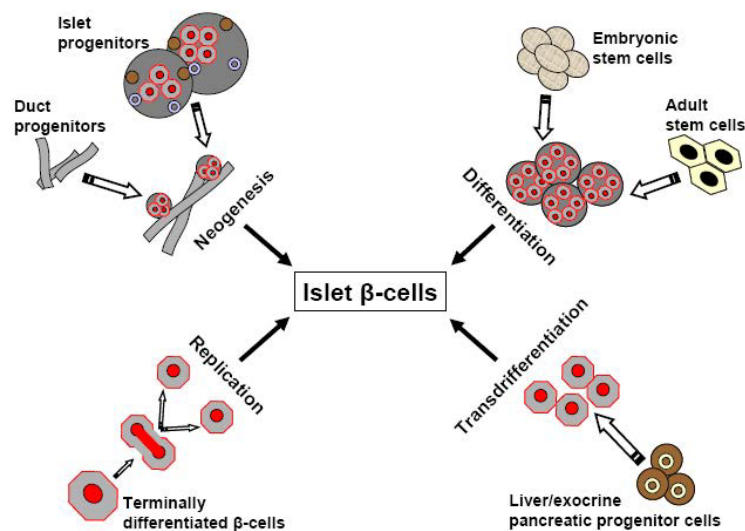


Figura 5. Esquematització de les diferents vies de reprogramació cel·lular per a l'obtenció directa de cèl·lules β [10].

2. ONTOGÈNIA DE LA CÈL·LULA β

2.1. Orígens embrionaris

Durant la gastrulació (fase inicial del desenvolupament embrionari) es defineixen tres capes germinals fonamentals en l'embrió: ectoderm, mesoderm i endoderm. L'ectoderm origina l'epidermis i el sistema nerviós. El mesoderm es converteix en el notocordi, el múscul, el cor, el ronyó, la vascularització, el mesènquima intestinal i la sang. L' **endoderm** dóna lloc a diversos òrgans al llarg de l'eix anteroposterior, més concretament als dels aparells digestiu i respiratori. L' endoderm faringi dóna lloc a la faringe, tim i glàndula tiroide. L' endoderm del tub digestiu anterior forma l'esòfag, pulmons, estómac, fetge, vesícula biliar i pàncrees. L' endoderm del tub digestiu mig origina els intestins primis i grossos fins al recte. En tots els casos, l' endoderm genera principalment el revestiment epitelial dels òrgans. El mesènquima mesodèrmic esplàncnic rodeja l'endoderm i és actiu en quan a induir i mantenir la seva proliferació i morfogènesi.

2.2. Morfogènesi pancreàtica

Durant l'embriogènesi dels vertebrats, el primer signe morfològic del desenvolupament pancreàtic és una evaginació de l'epiteli endodèrmic dorsal i una condensació del mesènquima dorsal que el revesteix. Aquesta formació de l'esbós pancreàtic dorsal és evident en l'etapa e9.5 en els ratolins i durant la quarta setmana de gestació en els éssers humans (els ratolins tenen 20 dies de gestació i els humans 38 setmanes aproximadament). Posteriorment, 12 hores més tard, l'esbós ventral resulta evident. Aquest s'origina a partir de l'epiteli aproximadament en la mateixa localització anteroposterior que el dorsal, en el costat ventral de l'intestí en la base del conducte biliar (fig.6). Segons avança el desenvolupament, el primordi pancreàtic dorsal comença a proliferar i ramificar-se, formant progressivament una estructura arborescent. Aquest procés comença al voltant del e10.5 i continua durant tot el desenvolupament. Entre el e11 i e12 l'intestí es plega i rota, fet que desplaça el primordi ventral dorsalment i el porta a la proximitat immediata del primordi dorsal. Els primordis es fusionen a continuació al voltant del e13. Al e14.5 (sisena setmana de gestació en l'ésser humà), els acinis i conductes es tornen clarament visibles com estructures nítides incloses en l'interior del teixit exocrí més abundant. Posteriorment, el pàncrees segueix creixent i expandint-se fins a l'edat adulta.

La diferenciació endocrina és aparent des de les etapes inicials més inicials del desenvolupament pancreàtic. Entre el e9.5 i el e12.5 la majoria de cèl·lules endocrines són positives per a glucagó. És a partir del e13.5 quan es produeix la diferenciació exponencial de les cèl·lules endocrines, en la seva majoria cèl·lules β , a partir de precursors (neogènesi) en la etapa que es coneix com **transició secundària** (e13-e16.5). Durant la transició secundària les cèl·lules endocrines es formen a partir de cèl·lules progenitores bipotents endocrí/ductal, situades en el que s'anomena domini troncal de l'epiteli pancreàtic, el qual pot ser distingit molecularment al voltant del e14.5 degut a l'expressió de diferents marcadors i factors de transcripció [11]. Cap al e16 les cèl·lules endocrines comencen a agrupar-se, però no és fins just abans de néixer (e18-e19) quan els illots estan plenament formats. La maduració final dels illots i en particular l'adquisició de la resposta secretora en resposta a glucosa es dona durant les primeres setmanes després del naixement.

El pàncrees exocrí inicia la seva diferenciació cap al e14.5 i és en el e15.5 quan els acins ja són clarament distingibles dels ductes. Pel que fa a les cèl·lules ductals, es coneix molt poc sobre el seu procés de diferenciació, a excepció de la majoria de precursors, les ductals es diferencien dels progenitors dels llinatges endocrí/exocrí abans del e12.5.

En humans, els primordis pancreàtics són evidents com ja he dit a partir de la quarta setmana de gestació i la seva fusió es produeix al final de la sisena setmana. Cèl·lules endocrines positives per a 4 de les 5 hormones insulars són presents ja durant la setmana deu de gestació. Cal destacar que existeixen pocs estudis moleculars sobre l'organogènesi pancreàtica en humans, per tant, els models vigents i descrits a continuació es basen majoritàriament en informació obtinguda en models animals de ratolí i pollastre majoritàriament.

En resum, el desenvolupament del pàncrees és un procés molt elaborat on tots els tipus pancreàtics (endocrí, acinar i ductal) deriven d'un grup comú de cèl·lules progenitores derivades de l'endoderm.

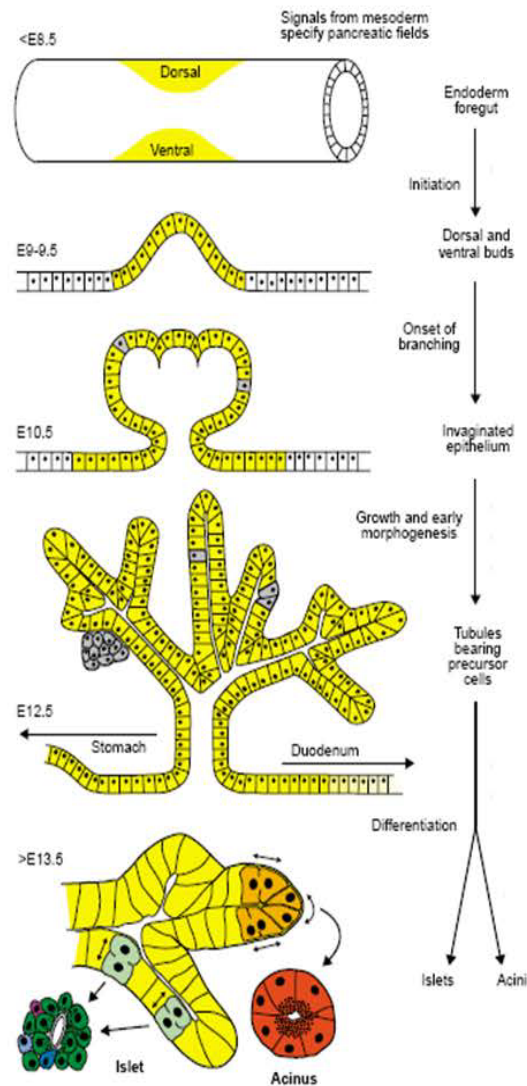


Figura 6. Visió general de la organogènesi pancreàtica del ratolí. La doble fletxa indica la direcció ortogonal de les divisions cel·lulars dels illots versus els precursors acinars/ductals. Adaptada de [12].

2.3. Xarxa transcripcional durant el desenvolupament pancreàtic

Des d'un punt de vista molecular, l'expansió i diferenciació dels precursors endodèrmics cap a un llinatge pancreàtic, són resultat d'una seqüència altament regulada de senyals extracel·lulars i de canvis en els programes d'expressió gènica. Aquests canvis són dirigits per una cascada de factors de transcripció on les seves activacions-inactivacions coordinades, permeten la progressió del precursor pluripotent a la cèl·lula pancreàtica diferenciada. La identificació d'aquests factors i de les relacions epistàtiques existents entre ells es indispensable per arribar a entendre els processos que culminen en la formació de les cèl·lules del illot (Fig.7).

2.3.1. Factors implicats en el desenvolupament primerenc del pàncrees

Pdx1 (*Pancreatic-duodenal homeobox gene-1*, també conegut com *Ip1*) ha estat considerat el marcador més primerenc de progenitors pancreàtics degut a que s'expressa a l'endoderm pre-pancreàtic ja a partir del e8.5, abans de que protrusioni el primordi pancreàtic. No obstant, també marca el sistema extrahepatobiliar, estómac i duodè. Pdx1 és un regulador clau en el desenvolupament pancreàtic i en la diferenciació de progenitors cap a un fenotip β . Poc abans del naixement, l'expressió de Pdx1 queda limitada a les cèl·lules β , δ i al duodè. Experiments *in vitro* demostren que Pdx1 regula l'expressió de gens específics com el de la insulina, somatostatina, glucocinasa, Glut2 i l'amilina.

Els ratolins deficientes en Pdx1 i els humans amb una mutació homozigota nul·la per Pdx1 neixen sense pàncrees, degut a la parada del desenvolupament de l'epiteli pancreàtic durant el procés inicial de formació dels primordis [13-15].

El patró d'expressió de Pdx1 al pàncrees varia durant el desenvolupament, així com durant en les primeres etapes és expressat per totes les cèl·lules epitelials no diferenciades, cap a l'estadi e13 la seva expressió queda restringida a les futures cèl·lules endocrines, principalment les cèl·lules β , sense desaparèixer del tot en les cèl·lules exocrines i ductals. Més enllà del desenvolupament, Pdx1 és necessari per al correcte funcionament de les cèl·lules β diferenciades [16].

Ptf1a (*Pancreas specific transcription factor 1a*, també conegut com *p48*), a diferència de Pdx1, a l'endoderm s'expressa exclusivament al pàncrees. Aquest factor té un paper molt important en els primers estadis d'especificació pancreàtica, juntament amb Pdx1 [17]. Ptf1a es comença a expressar immediatament després de Pdx1 a e9.5 en tots els progenitors pancreàtics, però al llarg del desenvolupament el patró d'expressió varia. Mentre que l'expressió continua en les cèl·lules epitelials no diferenciades i en les cèl·lules acinars, la seva expressió disminueix en les cèl·lules endocrines. De fet, nivells molt baixos d'expressió poden ser detectats en els progenitors endocrins inicials [18]. Estudis en l'aparició dels diferents llinatges pancreàtics corroboren que dels progenitors Ptf1a positius deriven totes les cèl·lules acinars, el 95% de les ductals, el 75% de les cèl·lules α i el 100% de les cèl·lules endocrines no α .

De la mateixa manera que passa amb els animals deficientes en Pdx1, els animals *Ptf1a*^{-/-} desenvolupen uns primordis pancreàtics rudimentaris, i el mateix passa en humans, on l'absència de Ptf1a dona lloc a l'agènesi pancreàtica [19]. Mentre que el paper que té Ptf1a en el desenvolupament exocrí és clar, en el cas de l'endocrí no ho és tant.

Tots dos factors es creien necessaris per a la formació del primordi pancreàtic dorsal, però estudis en *Xenopus* i ratolí demostren l'existència d'un programa genètic paral·lel conduint l'especificació del pàncrees dorsal [20].

Més recentment s'ha demostrat el paper de **Sox17** en l'especificació del pàncrees ventral [21]. Aquest amb Ptf1a són crucials per al desenvolupament correcte del pàncrees ventral, mentre que el factor de transcripció **Hb9** juga un paper clau en la morfogènesis del pàncrees dorsal.

Hb9 (Hlxb9) és un factor de transcripció amb una homoseqüència que s'expressa de forma transitòria en regions de l'endoderm que donaran lloc a l'aparell respiratori i digestiu, inclòs el primordi pancreàtic. En el pàncrees dorsal s'expressa poc abans que Pdx1 i en el ventral de forma simultània. A mesura que avança el desenvolupament, la seva expressió queda delimitada a les cèl·lules β . Els animals deficients per Hb9 no presenten formació del primordi dorsal, amb un fenotip més sever que no pas els animals Pdx1^{-/-}, mentre que el pàncrees ventral es desenvolupa de manera normal [22, 23]. La necessitat de Hb9 demostra una distinció molecular clara entre el pàncrees dorsal i ventral.

Sox9 també és un factor de transcripció pancreàtic primerenc i és essencial per a la correcta expansió del pàncrees. Es va identificar com a marcador de progenitors pancreàtics pluripotents i la seva expressió co-localitza amb Pdx1 en estadis inicials del desenvolupament pancreàtic. En estadis postnatsals, l'expressió de Sox9 es veu restringida a les cèl·lules ductals. Els animals deficients per Sox9 específics de pàncrees moren poc després de néixer, i presenten una reducció en la mida del pàncrees que ja és evident a e11.5 afectant tant al pàncrees dorsal com al ventral, fet que indica que Sox9 és necessari per a l'expansió de la massa pancreàtica abans del procés de diferenciació [24]. És un mediador clau per a la determinació de les cèl·lules progenitores endocrines Neurog3 positives.

Tenint en compte el paper clau de Pdx1 i Ptf1a en el desenvolupament temprà del pàncrees, un punt important del seu estudi recau en la cerca dels factors de transcripció que regulen la seva expressió. Tant **Foxa2** (Hnf3 β) com **Hnf6** (Onecut1) han estat identificats com a activadors potencials de l'expressió de Pdx1, però contradictòriament a aquesta funció, tots dos són dispensables per a l'activació de Pdx1 i la morfogènesi pancreàtica [25, 26]. De forma similar, algunes evidències apunten al factor de transcripció **Hnf1 β** (Tcf2) com a regulador de Ptf1a [27].

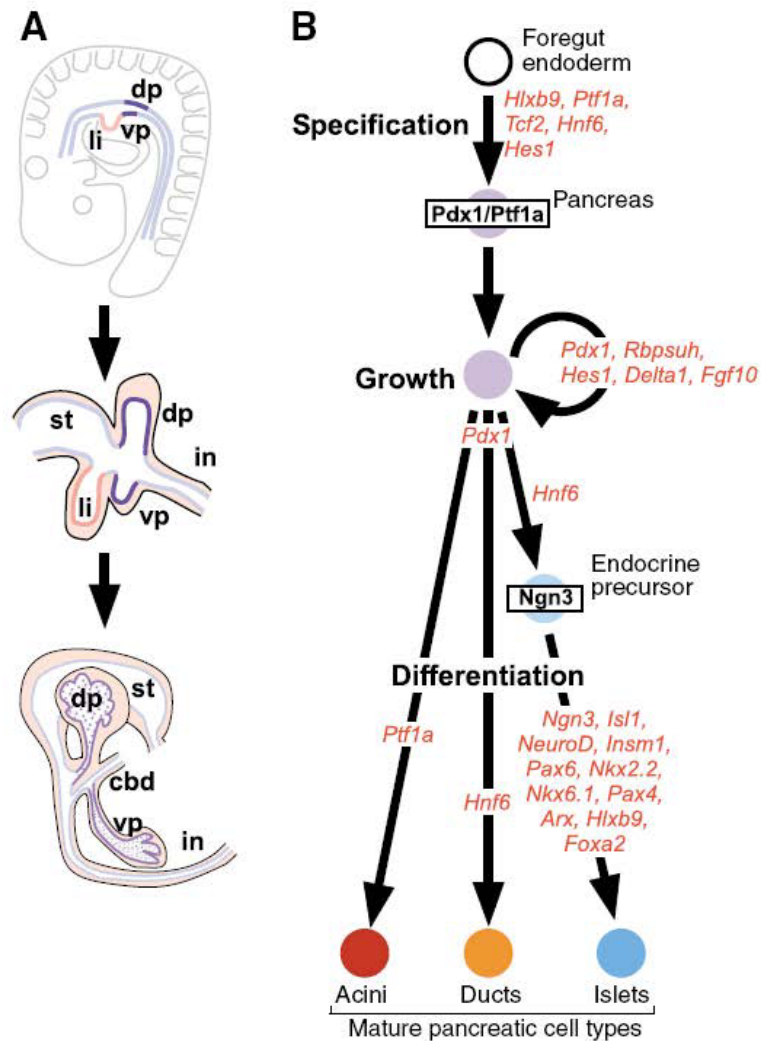


Figura 7. Anatomia pancreàtica, llinatges i gens. A) Els primordis dorsal i ventral (dp i vp respectivament) es formen de forma inicial adjacents al primordi hepàtic (li). Cap al e15.5 en pàncrees ocupa la posició entre l'estómac (st) i l'intestí (in). Amb la rotació de l'intestí (a partir del e12.5 i endavant) els dos primordis pancreàtics es fusionen mantenint la connexió amb l'intestí i/o el conducte biliar (cbd). **B)** El rastre de llinatges indica que totes les cèl·lules pancreàtiques madures deriven d'uns progenitors que expressen Pdx1 i/o Ptf1a (lila), i els següents tipus de progenitors expressen Neurog3 i es diferencien en cèl·lules del illot. Els gens llistats en vermell són requerits per diferents aspectes dels passos indicats [28].

En els últims anys s'ha avançat molt en el coneixement dels factors de transcripció que intervenen en la correcta formació del pàncrees, gràcies a la creació de models transgènics de ratolí per a diferents factors, que ha permès l'estudi dels canvis fenotípics observats. Aquests factors de transcripció, juntament amb els fenotips observats en els models animals corresponents, es detallen en la taula 2.

FACTOR	TIPUS	INICI	EXPRESSIÓ I FUNCIONS	FENOTIP PANCREÀTIC EN MODELS MUTANTS DE RATOLÍ
Sox17	HMG box	≤e5.5	Expressat en l'endoderm post gastrulació. Assigna un destí ventral vs hextrahepatobiliar	<i>Foxa3-Cre; Sox17^{fl/fl}</i> : pèrdua del primordi biliar; pàncrees ectòpic en el ducte. <i>Pdx^{tra/+}</i> ; <i>tetO-Sox17</i> : dp i vp agènesis
Foxa2/Hnf3β	Winged helix	≤e5.5	Expressat en l'endoderm pancreàtic primerenc; restringit a les cèl·lules acinars i endocrines al final de la gestació; necessari per a la funcionalitat del illot	<i>Foxa2^{-/-}</i> : letal embrionari; absència de l'endoderm de l'intestí anterior. <i>Foxa3-Cre; Foxa2^{fl/fl}</i> : hipoglicèmia; hipoglucagonèmia; pèrdua de cèl·lules α. <i>Ins-Cre; Foxa2^{fl/fl}</i> : hipoglicèmia hiperinsulinèmica
Hnf6/OC1	HD	≤e9.0	Expressat en les cèl·lules PPM i es restringeix a les cèl·lules acinars i ductals; necessari per a la diferenciació endocrina	<i>Hnf6^{-/-}</i> : hipoplàsia dp i vp que es manté en estadi post-natal, degut a una expressió de <i>Pdx1</i> retardada; pèrdua de progenitors endocrins <i>Neurog3⁺</i> ; reducció en el nombre de cèl·lules endocrines
Hb9 (del gen <i>Hlxb9</i>)	HD	≤e8.0	Endoderm de l'intestí anterior i mig, més endavant en vp i dp; es restringeix a la cèl·lula β. Necessari per al desenvolupament dorsal i la diferenciació final de la cèl·lula β	<i>Hlxb9^{-/-}</i> : agènesi del dp; reducció del nombre de cèl·lules β en pàncrees ventral, amb disminució de l'expressió de <i>Glut2</i> i <i>Nkx6.1</i> ; augment de cèl·lules δ.
Hnf1β/Tcf2/vHnf1	HD	≤e8.5	Expressat en les cèl·lules PPM; necessari per al creixement dels primordis pancreàtics	<i>Tcf2^{-/-}</i> : vp indetectable; aturada del creixement en dp ≥e10.5 i pèrdua cap a e13.5 degut a una reducció en proliferació
Isl1	HD	≤e9.0	Expressat en el mesènquima dorsal pancreàtic i cèl·lules endocrines. Necessari per al creixement de l'epiteli pancreàtic i la diferenciació endocrina. Necessari per a la maduració, proliferació i supervivència en la transició secundària	<i>Isl1^{-/-}</i> : absència del mesènquima dorsal pancreàtic i diferenciació exocrina defectiva; aturada de la diferenciació exocrina degut a la seva funció en les cèl·lules epitelials. <i>Pdx1-Cre^{late}</i> ; <i>Isl1^{fl/fl}</i> : hiperglicèmia; hipoplàsia del illot; nombre reduït de progenitors tardans <i>Pax6⁺</i> ; disminució de proliferació i increment de l'apoptosi de cèl·lules endocrines; maduració de cèl·lules endocrines defectuosa
Pdx1	HD	e8.5–e8.75	Expressat en les cèl·lules PPM i després en les cèl·lules β; necessari per al creixement dels primordis pancreàtics	<i>Pdx1^{-/-}</i> : agènesi del vp; aturada del creixement en el dp ≥e10.5. <i>Pdx1^{+/-}</i> : intolerància a la glucosa, GSIS alterat; augment de la susceptibilitat a apoptosi de cèl·lula β
Ptf1a	bHLH	e8.5–e8.75	Expressat en les cèl·lules PPM i després en cèl·lules acinars; promou el destí pancreàtic ventral i guia el programa acinar	<i>Ptf1a^{-/-}</i> : agènesi vp (les cèl·lules adopten destí intestinal i CBD); aturada del creixement dp ≥e10.5; en dp, cèl·lules endocrines presents, però pèrdua de les acinars
Hes1	bHLH		Manté les cèl·lules PPM prevenint la sortida de cicle i la diferenciació reprimint <i>Neurog3</i> i <i>p57</i> , respectivament	<i>Hes1^{-/-}</i> : hipoplàsia de dp i vp degut a una reducció del conjunt de cèl·lules PPM per una diferenciació prematura; disgènesi acinar; pàncrees ectòpic en l'estómac distal, duodè i CBD

Sox9	HMG box	≤e9.0	Expressat en les cèl·lules PPM; necessari per al creixement dels primordis pancreàtics i la generació de progenitors endocrins Neurog3 ⁺	<i>Pdx1-Cre^{early}</i> ; <i>Sox9^{fl/fl}</i> : hipoplàsia vp i dp de degut a una reducció del conjunt de cèl·lules PPM; increment de l'apoptosi, reducció de la proliferació i diferenciació prematura <i>Pdx1-Cre^{early}</i> ; <i>Sox9^{fl/+}</i> : hipoplàsia del illot degut a una disminució en el nombre de cèl·lules progenitores Neurog3 ⁺
Nkx6.1	HD	≤e9.0	Expressat en les cèl·lules PPM, progenitors endocrins Neurog3 ⁺ i després cèl·lules β. Especificació de PPM a través d'un destí endocrí/ductal. Necessari per la diferenciació de la cèl·lula β	<i>Nkx6.1^{-/-}</i> : 85% de reducció en el nombre de cèl·lules β; pèrdua addicional de cèl·lules α en mutants <i>Nkx6.1^{-/-}</i> ; <i>Nkx6.2^{-/-}</i> . <i>Nkx6.1^{-/-}</i> : expressió troncal ectòpica de Ptf1a i pèrdua de cèl·lules Neurog3 ⁺ ; ambdós més accentuats en animals <i>Nkx6.1^{-/-}</i> ; <i>Nkx6.2^{-/-}</i>
Nkx6.2	HD	≤e10.5	Expressat en cèl·lules PPM, i després a e15.5, només en algunes cèl·lules glucagó ⁺ i acinars. Funcionalment equivalent a Nkx6.1	<i>Nkx6.2^{-/-}</i> : cap fenotip pancreàtic obvi
Ngn3	bHLH	≤e9.5	Marcador de cèl·lula endocrina progenitora, i després expressat en cèl·lules del illot. Indueix a les cèl·lules d'una manera autònoma cap a llinatge endocrí; necessari per a la formació de totes les cèl·lules endocrines. Manté la funció endocrina	<i>Neurog3^{-/-}</i> : absència de totes les cèl·lules pancreàtiques endocrines i les enteroendocrines; dis-morfogènesi acinar; <i>Ins2-Cre</i> ; <i>Neurog3^{fl/fl}</i> : hiperglicèmia; maduració de la cèl·lula β defectuosa
Ia1/Insm1	Zinc finger	≤e9.5	Expressat en progenitors endocrins i en algunes cèl·lules endocrines diferenciades d'una manera Neurog3-dependent	<i>Ia1^{-/-}</i> : diferenciació defectuosa de cèl·lules α i β, i de cèl·lules enteroendocrines
NeuroD1/Beta2	bHLH	≤e9.5	Expressat en cèl·lules en diferenciació i en cèl·lules endocrines madures. Necessari per a formació normal de l'illot, i per a l'adquisició i manteniment del fenotip responedor a glucosa de les cèl·lules β	<i>NeuroD1^{-/-}</i> : hipoplàsia de l'illot i disgènesi, apoptosi endocrina i diferenciació aberrant; diferenciació enteroendocrina interrompuda. <i>RIP-Cre</i> (or <i>Pdx1-Cre^{ERT}</i>); <i>NeuroD1^{fl/fl}</i> : hiperglicèmia; insulina pancreàtica disminuïda (mRNA <i>ins1</i> disminuït); immaduresa de cèl·lula β
Nkx2.2	HD	≤e9.5	Expressat en cèl·lules PPM, i després en cèl·lules α, β i PP. Necessari per al desenvolupament de cèl·lules β i α	<i>Nkx2.2^{-/-}</i> : pèrdua de cèl·lula β, α i PP; expansió de cèl·lula ε.
Pax4	HD	≤e9.5	Expressat en progenitors endocrins, i després es restringeix a cèl·lules β i δ; expressió dependent de Neurog3. Promou l'assignació a destí cel·lular β	<i>Pax4^{-/-}</i> : pèrdua de cèl·lules β i δ; expansió de cèl·lules ε i α
Arx	HD	≤e9.5	Expressat en cèl·lules α i PP de manera Neurog3-dependent; promou l'adquisició del destí cel·lular α i PP; reprimeix el destí cel·lular β i δ	<i>Arx^{-/-}</i> : pèrdua de cèl·lula α; expansió de cèl·lules β i δ
Rfx6	Winged Helix	≤e9.0	Expressat en els progenitors endocrines i en tots els tipus cel·lulars de l'illot d'una manera dependent a Neurog3. Limita l'expressió de Nkx6.1	<i>Rfx6^{-/-}</i> : Petites obstruccions intestinals, hipoplàsia pancreàtica, pèrdua de totes les cèl·lules que expressin hormones (excepte PP); activació parcial del programa endocrí

MafA	Basic Leucine Zipper	≤e13.5	Activador del gen de la insulina. Expressió exclusiva en cèl·lules insulina+, de e13.5 endavant	<i>MafA</i> ^{-/-} : No té un fenotip pancreàtic obvi, desenvolupament d'intolerància a la glucosa post-natal
MafB	Basic Leucine Zipper	≤e10.5	Expressat en cèl·lules insulina i glucagó positives a e12.5. Expressió exclusiva a les cèl·lules α post-natalment. Regula l'expressió de factors clau requerits en la maduració de les cèl·lules α i β	<i>MafB</i> ^{-/-} : Reducció del nombre de cèl·lules α i β durant el desenvolupament mentre el nombre total de cèl·lules no està afectat. Neogènesi de cèl·lules insulina ⁺ retardat

Taula 2. Visió general dels factors de transcripció que governen el desenvolupament i la formació de les cèl·lules β del pàncrees, juntament amb els fenotips dels models mutants de ratolí per aquests factors (Adaptat de [20]).

Durant la primera transició (e9.5-e11.5) la majoria de cèl·lules pancreàtiques estan encara indiferenciades i coexpressen Pdx1 i Ptf1a. Basat en aquestes propietats, les cèl·lules Pdx+ i Ptf1a+ de l'epiteli pancreàtic primerenc són denominades **progenitors pancreàtics multipotents (PPM)**. El manteniment de la mida d'aquest grup de PPM és crític per a la morfogènesi normal i per la grandària final del pàncrees. Entre e12 i e14 aquest domini aparentment homogeni de PPM es resol en un domini preacinar format per cèl·lules determinades a un llinatge exocrí en la zona més distal anomenada "punta" de l'epiteli pancreàtic ramificat i en un domini compromès a un llinatge endocrí o ductal en la zona més central anomenada "tronc".

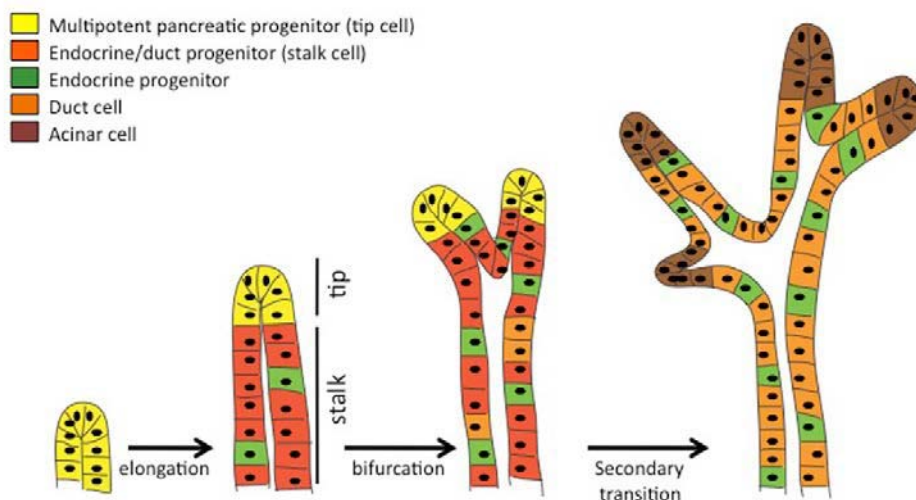


Figura 8. Localització dels progenitors endocrins durant la morfogènesi pancreàtica [29].

2.3.2. Factors implicats en la inducció del compartiment endocrí

Una vegada les cèl·lules estan predestinades a llinatge pancreàtic, són necessaris altres factors que regulin el pas d'aquest progenitors pluripotents comuns a cèl·lules endocrines, exocrines i ductals. Per a la determinació endocrina la cascada proposada és la següent:

Inactivació Delta/Notch. La via de senyalització Notch és la responsable de moltes decisions binàries del destí cel·lular en la majoria d'organismes multicel·lulars. En el pàncrees, i de manera semblant succeeix durant el desenvolupament neural, aquesta senyalització cèl·lula-cèl·lula coneguda com "inhibició lateral" (fig.9), es considera responsable de l'especificació endocrina. Les cèl·lules que han de diferenciar-se a llinatge endocrí utilitzen aquest tipus de senyalització per forçar a les cèl·lules veïnes a adoptar un fenotip no endocrí [30] (*per més informació veure secció 2.4*).

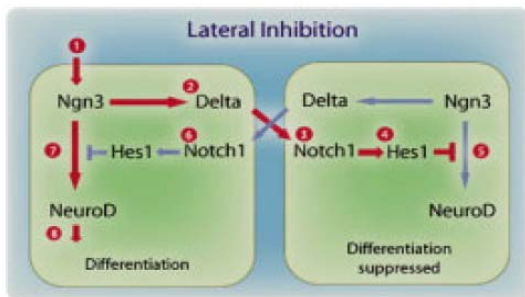


Figura 9. El procés de selecció d'un precursor endocrí està acompanyat de senyals cèl·lula-cèl·lula. Aquest procés de senyalització ocorre a través d'un augment progressiu dels nivells de Neurog3 en la cèl·lula en diferenciació (esquerra) amb una disminució en la cèl·lula veïna (dreta) [31].

L'expressió de **Neurog3** en els progenitors pancreàtics és crucial per a la seva determinació a llinatge endocrí. Mentre que Neurog3 és detectable als primordis pancreàtics des del e9.5, la seva expressió no augmenta de manera notòria fins la transició secundària (on té el seu punt màxim a e14.5, coincidint amb la generació de les cèl·lules endocrines). A partir de llavors, la seva expressió disminueix fins nivells gairebé indetectables en les cèl·lules endocrines diferenciades [32, 33] (fig.10) (*per més informació veure secció 3.2*).

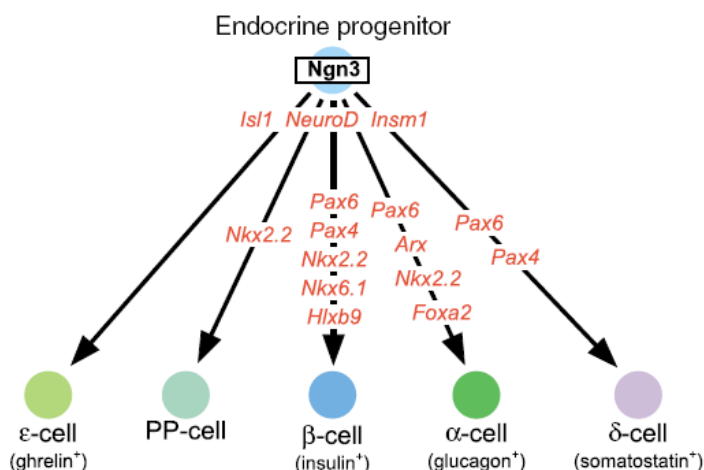


Figura 10. Vies d'especificació dels diferents subtipus del illot. Diagrama hipotètic de l'especificació dels diferents subtipus del illot a partir de precursors Neurog3+ [28].

NeuroD1 és una diana directa de Neurog3 que en el pàncrees en desenvolupament es detecta en cèl·lules disperses per l'epiteli que coexpressen glucagó ja en el e9.5 en el ratolí. S'ha vist que transactiva els gens de la insulina, glucagó, Pdx1 i secretina. L'anàlisi de la seva expressió revela que es superposa en part amb la de Neurog3 i que Neurog3 ectòpicament pot induir la seva expressió en diferents contextos cel·lulars [34, 35]. La inactivació dirigida d'aquest gen ocasiona la mort dels ratolins mutants poc dies després de néixer [36]. Un examen més detallat del pàncrees embrionari d'aquests ratolins va revelar que les cèl·lules endocrines no arriben a organitzar-se en illots madurs i el seu nombre disminueix pràcticament en un 60% al voltant del e17.5 durant el desenvolupament embrionari. Concretament, el nombre de cèl·lules β és el que es redueix de forma considerable. Es creu que el descens en el nombre de cèl·lules endocrines es deu a un augment de la mort cel·lular programada, i conseqüentment s'ha senyalat la importància de NeuroD1 en la supervivència enlloc de la diferenciació dels progenitors endocrins del pàncrees (*per més informació veure secció 3.3*).

El factor de transcripció **IA1** també es va identificar com una diana directa de Neurog3 [37]. Els ratolins mutants per aquest factor mostren una deficiència en la diferenciació de les cèl·lules α i β , i també de les cèl·lules enteroendocrines de l'intestí. Aquest fenotip es deu a una dis-regulació negativa dels factors de transcripció que promouen la diferenciació de les cèl·lules β (fig.11) [38].

Fascinantment, la inactivació de IA1 i NeuroD1 fenocòpien la dis-gènesi enteroendocrina del ratolins gen-anul·lat per Neurog3, eludint als paral·lelismes que existeixen entre els programes transcripcionals que governen la diferenciació endocrina en el pàncrees i en l'intestí.

2.3.3. Factors implicats en la determinació dels diferents subtipus de cèl·lules endocrines

Encara queda per resoldre si l'especificació dels 5 subtipus cel·lulars del illot ocorre abans de la inducció de Neurog3. La manipulació dels diferents programes transcripcionals després de l'expressió de Neurog3 han incrementat el coneixement del control molecular en la diferenciació terminal de les cèl·lules de l'illot. A més a més, aquests estudis han posat de manifest que existeix una plasticitat considerable entre els 5 tipus de cèl·lules endocrines després de que s'hagi iniciat l'expressió de Neurog3.

Factors Pax. Els gens *Pax* codifiquen factors de transcripció que regulen diversos aspectes del desenvolupament embrionari i l'organogènesi. **Pax4** s'expressa en l'epiteli pancreàtic a partir del e9.5. Posteriorment, al voltant de e15.5 s'expressa en una població més gran de cèl·lules, entre elles

les que expressen insulina. Més endavant, Pax4 queda limitat a les cèl·lules β en l'adult. El ratolins mutants per Pax4 moren poc després de néixer per diabetis, presenten una pèrdua completa de cèl·lules β i δ madures i un augment associat de les cèl·lules α . **Pax6** s'expressa en els primordis pancreàtics a partir del e9 i continua en els 5 tipus cel·lulars durant la vida fetal i post-natal. Els models gen-anul·lats per Pax6 no desenvolupen cèl·lules α , i la resta de cèl·lules estan presents però no s'agreguen de manera adequada per formar illots madurs. Els ratolins sense Pax4 i Pax6 no desenvolupen cap cèl·lula endocrina madura. Sembla probable que els gens Pax siguin necessaris per al manteniment del destí o la maduració de les cèl·lules endocrines [39, 40].

Pax4 inhibeix directament l'expressió del factor de transcripció **Arx** [41]. El fet que els animals Pax4^{-/-} presentin una expansió de les cèl·lules α , en detriment de les poblacions cel·lulars β i δ , reflecteix que Pax4 actua com un repressor transcripcional competint amb Arx. Arx està per sota de Neurog3 en la cascada transcripcional endocrina, ja que els animals Neurog3^{-/-} no presenten expressió d'aquest factor. Arx participa de forma clara en la diferenciació del llinatge α , ja que els animals deficientes per aquest factor no presenten aquest tipus cel·lular [41]. Contràriament, la sobreexpressió de Arx en progenitors pancreàtics Pdx1⁺ resulta en la transformació de moltes cèl·lules precursoras β i δ cap als llinatges α i PP [42], donant suport a la idea d'aquests efectes contraposats entre Pax4 i Arx en la determinació dels llinatges endocrins.

Factors NK. Nkx2.2 s'expressa en totes les cèl·lules de l'epiteli pancreàtic primitiu (just després de l'activació de Pdx1) i es manté fins al e13. En aquest moment, la seva expressió queda restringida als progenitors Neurog3+ (el gen de Nkx2.2 és activat per Neurog3) i finalment en l'adult la seva expressió perdura en les cèl·lules α , β i PP [43]. Els ratolins gen-anul·lats per aquest factor presenten una reducció significativa d'aquest tres tipus cel·lulars, no sintetitzen insulina i moren pocs dies després de néixer per una hiperglicèmia intensa. El patró d'expressió de **Nkx6.1** durant el desenvolupament pancreàtic és similar al de Nkx2.2, però en l'adult la seva expressió queda restringida a les cèl·lules β [44]. La inactivació dirigida d'aquest factor en models murins demostren la necessitat específica d'aquest factor per a la diferenciació de la cèl·lula β .

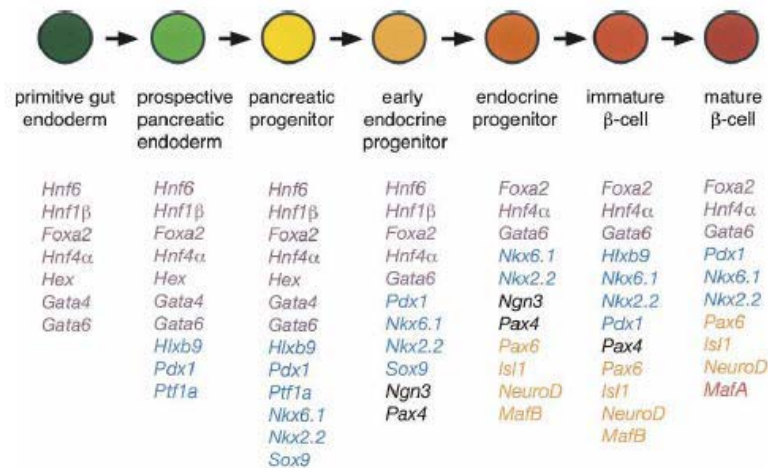


Figura 11. Perfil d'expressió dels diferents factors de transcripció durant les diferents fases per a la formació d'una cèl·lula β a partir de derivats endodèrmics. Factors expressats en una fase en concret segueixen el següent codi de colors: endoderm intestinal (lila), progenitors pancreàtics endodèrmics (blau), progenitors endocrins inicials (negre), progenitors endocrins (taronja) i cèl·lula β (roig) [9].

2.4. Importància de les senyals extracel·lulars en el desenvolupament pancreàtic

El procés de desenvolupament per a la formació d'un òrgan, és un procés molt fi on la proliferació i diferenciació, la supervivència i l'apoptosi són regulats per nombroses senyals extracel·lulars (autocrines i paracrines). En el cas del pàncrees, la notocorda i el mesènquima que envolten l'epiteli pancreàtic secreten diferents factors que determinen l'especificació i el creixement dels primordis pancreàtics. Posteriorment, el mesènquima alliberarà les senyals necessàries per a la migració, adhesió i formació dels illots pancreàtics [45]. Alguns d'aquests senyals són mediadors d'unió cèl·lula-cèl·lula, proteïnes insolubles de la matriu extracel·lular o factors solubles (fig.12) [46].

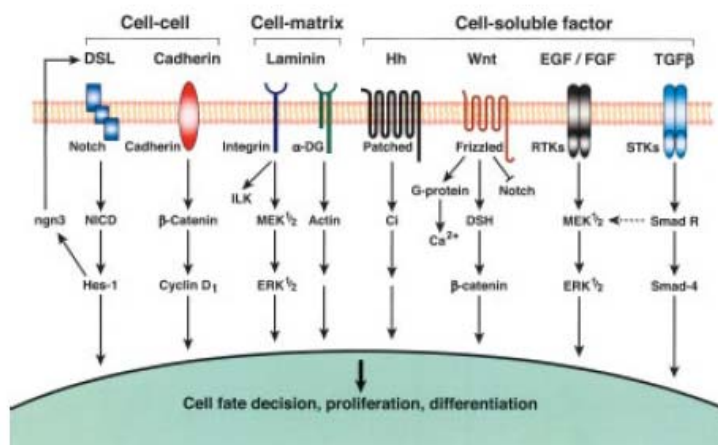


Figura 12. Esquema de les tres classes majoritàries de factors extracel·lulars involucrats en el desenvolupament pancreàtic.

Juntament amb l'establiment de xarxes transcripcionals descrites en els apartats anteriors, l'activació i/o repressió de certes vies de senyalització intracel·lulars són necessàries per al correcte desenvolupament del pàncrees. Entre aquestes vies trobem la via de senyalització Hedgehog (Hh), la via del factor de creixement fibroblàstic (Fibroblast Growth factor, FGF), la via Notch, la via Wnt, la via de senyalització BMP (Bone morphogenetic proteins) i la via del factor de creixement transformant beta (Transforming Growth Factor beta, TGF- β) [9, 47].

A part de senyals intrínsecs, ja en els anys 60 es va revelar que el creixement i diferenciació del epitelí pancreàtic és dependent de les senyals provinents dels mesènquima adjacent. Però és relativament recent la caracterització d'aquests factors gràcies a l'ús de models animals [20].

Els canvis en l'expressió temporal i espacial de la **via de senyalització Hh** regulen diferents aspectes de la formació del pàncrees inicial i del compartiment endocrí específicament. Es coneix que l'expressió de Hh en etapes inicials del desenvolupament pancreàtic, inhibeix la formació de l'òrgan i l'expressió primerenca de Pdx1 [48]. Hi ha estudis que suggereixen que aquesta via podria estar regulant el nombre de progenitors pancreàtics a través de la supervivència, proliferació i estat de diferenciació d'aquestes cèl·lules [9]

Senyalització FGF. Del gran espectre de lligands i receptors de FGF expressat en el pàncrees en desenvolupament, l'eix FGF10 i el seu receptor FGFR2IIIb és el més caracteritzat. FGF s'expressa en els primordis dorsal i ventral a partir del e9.5-e11.5 i sense cap d'aquests dos elements es produeix una hipoplàsia pancreàtica degut a una disminució de la proliferació del grup inicial de progenitors, demostrant que la senyalització FGF10 és necessària per al manteniment dels PPM [49].

Via Notch. Existeixen nombroses evidències de que aquesta via està involucrada en el manteniment de l'estat indiferenciat dels progenitors. La inactivació dels component de la via Notch *Hes1* (efector en el pàncrees que es situa per sota de Notch), *RBP-Jk*, o *Dll1* porta a una aturada de cicle, a una precoç diferenciació endocrina, i a una depleció del grup inicial de PPM, resultant en una hipoplàsia pancreàtica [50, 51]. A més a més de reprimir l'inhibidor de cicle dependent de ciclina *p57* en les PPM, *Hes1* també reprimeix el factor de transcripció proendocrí Neurog3 [52]. També *Hes1* juntament amb altres proteïnes vinculades de la via inhibeixen *Ptf1a*, el qual a part de ser necessari per a l'especificació del pàncrees, posteriorment és necessari per a l'adquisició del llinatge acinar [53]. La senyalització Notch manté en l'epitelí pancreàtic l'estat indiferenciat dels progenitors.

Senyalització BMP i Wnt. Mentre l'activació de la via Wnt es pot detectar en les cèl·lules de l'epiteli pancreàtic [54], la senyalització per BMP està restringida al mesènquima temprà [55]. Un gran obstacle en la caracterització d'aquests factors de senyalització en la morfogènesi pancreàtica és la gran redundància que existeix entre el gran nombre de lligands i receptors que poden emascarar funcions importants en models de pèrdua de funció.




La **senyalització TGF- β** s'ha identificat tant en mesènquima com en epiteli pancreàtic, així com també en illots adults i en desenvolupament. Diferents estudis en animals assenyalen la importància d'aquesta via en el desenvolupament endocrí, però la manera com aquesta influeix en la formació, supervivència o expansió dels progenitors endocrins i de les cèl·lules endocrines diferenciades no s'ha pogut establir.




3. FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ basic Helix Loop Helix (bHLH) i PÀNCREES

3.1. Visió general de la superfamília bHLH

Les proteïnes basic helix-loop-helix formen una família extensa de factors de transcripció que juguen un paper clau en nombrosos processos de desenvolupament incloent la determinació de llinatges cel·lulars, la diferenciació cel·lular i la determinació del gènere. El tret característic entre tots aquests factors és el domini bHLH, que té al voltant de 60 aminoàcids de llargària i està format per un domini bàsic d'unió a DNA i a continuació un domini HLH constituït per dos hèlixs amfipàtiques, cadascuna de 15-20 aminoàcids, separades per un llaç (loop) de llargada i seqüència variable. El domini HLH permet la dimerització amb altres membres de la família per formar complexos d'homo- o heterodímers. Els dos dominis bàsics que s'obtenen a partir de la dimerització, s'uneixen a zones específiques de DNA conegudes com **caixes E**, les quals estan formades per la seqüència consens de sis parells de bases **CANNTG**. La diversitat i les diferents combinacions de proteïnes dimèriques d'aquesta família de reguladors transcripcionals, possibilita la regulació d'una gran varietat de programes de desenvolupament [56].

El primer motiu bHLH va se identificat en els factors de transcripció murins E12 i E47. Des de llavors, més de 600 proteïnes bHLH han estat identificades en una gran varietat d'organismes, des de llevats a humans. Degut al gran nombre de proteïnes identificades amb un domini bHLH, es va fer una classificació en 6 grups (grup A, B, C, D, E i F), en base al seu parentesc evolutiu, conservació de residus en certa posició en el domini bHLH, especificitat d'unió per una caixa E i la presència de dominis addicionals [57] (taula 3).

CLASSIFICACIÓ	CARACTERÍSTIQUES	EXEMPLES	FUNCIONS
Grup A 	Classe I: Ampla expressió. Capaces d'homo- i heterodimeritzar. Classe II: Expressió específica de teixit. Heterodimeritzen amb les classe I.	E12/E47; E2-2A/B (proteïnes E) Neurog3; Mash1	Neurogènesi, miogènesi, hematopoesi, etc.
Grup B 	Posseeixen un motiu cremallera de leucines adjacent al bHLH	Myc; Max; Mad	Proliferació, diferenciació, apoptosi, etc.
Grup C 	Presenten un domini PAS adjacent al bHLH	Hif1 α , AHR	Resposta a hipòxia, a hidrocarburs aromàtics, etc.

Grup D 	Mancaça del domini bàsic d'unió a DNA; actuen com dominants negatius del grup A	Factors ID	Proliferació, diferenciació, angiogènesi, etc
Grup E 	Tenen una prolina conservada en la regió bàsica	HES, HERS1	Ruta de senyalització Notch, proliferació, etc.
Grup F 	Tenen un motiu atípic HLH amb una hèlix2 duplicada i un domini d'unió a ADN i transactivació COE	EBF1-4	Miogènesi, limfogènesi, neurogènesi, etc.

Taula 3. Taula resum dels 6 grup existents de factors bHLH. H1-L-H2: domini HLH (H1: hèlix1, L: llaç, H2: hèlix2; b: regió bàsica; LZ: cremallera de leucines (*leucine zipper*); PAS: domini PAS; Pro: prolina.

Resumint, el **grup A** s'uneix a les caixes E CAGCTG o CACCTG, i inclou els factors d'expressió ubiqua E12 i relacionats, coneguts com proteïnes E (E12, E47, E2-2 i HEB), i els factors teixit específic com els factors Neurogenina/NeuroD, PtfA o MyoD. En la majoria dels casos, els factors teixit específics necessiten dimeritzar amb proteïnes E per formar heterodímers actius, i la unió d'aquest heterodímers amb el DNA resulta en l'activació transcripcional dels seus gens diana. Cal remarcar que les proteïnes del grup A són denominades com classe I (proteïnes E) i classe II (teixit específiques), degut a que en la seva classificació inicial es va tenir en compte el patró de distribució en els diferents teixits i la seva capacitat per dimeritzar [58].

Per l'altra banda, el **grup B** està format per proteïnes funcionalment no relacionades on la majoria d'elles contenen un domini conegut com cremallera de leucines (Leucine zipper, LZ) contigu a la segona hèlix del domini HLH. Aquest grup de factors s'uneixen a les caixes E CACGTG o CATGTTG. Igual que el domini HLH, la LZ també està involucrada en la dimerització proteica. La proteïna més representativa d'aquest grup de bHLH-LZ és Max, el qual pot homo- o heterodimeritzar amb altres proteïnes del grup B com Myc o Mad. La xarxa Mad/Myc/Max té un gran nombre de dianes gèniques involucrades en el cicle cel·lular i es considera que funciona com un mòdul de transcripció [59].

El **grup C** correspon a la família de bHLH coneguda com bHLH-PAS, ja que els seus membres a més a més del domini bHLH, contenen un domini PAS. El domini PAS té uns 260-310 aminoàcids de llargària i permet la interacció de proteïnes PAS i no-PAS, i també la unió de petites molècules com la dioxina. Aquest grup de factors s'uneixen als motius ACGTC o GCGTG i solen intervenir en la resposta transcripcional de contaminants mediambientals (receptor d'hidrocarburs d'aril o ARNT) i baixa

tensió d'oxigen (factors induïbles per hipòxia o HIF), però també controlen certs aspectes del desenvolupament neural (proteïnes SIM) [60].

El **grup D** està representat pels inhibidors de diferenciació o factors ID, els quals la característica principal és que no tenen el domini bàsic d'unió a DNA. Aquestes proteïnes poden dimeritzar amb altres membres del grup A, però aquests dímers perden la capacitat d'unió a DNA, les proteïnes ID funcionen com a reguladors dominants negatius de les proteïnes bHLH classe A. Degut a que nombrosos factors bHLH regulen positivament molts dels seus gens diana durant la determinació del destí cel·lular i la diferenciació, el terme ID oportunament reflecteix l'habilitat d'aquest grup de proteïnes per inhibir la unió a DNA i la diferenciació [56].

El **grup E** de proteïnes està format per tres famílies de proteïnes identificades en *Drosophila*: la família Gridlock/Hey, la família Enhancer of Split (E(Sp)) i la família Hairy, que estan representades per les famílies HES i HERP en mamífers. A diferència dels grups anteriors, homodímers del grup E reconeixen caixes N de seqüència CACGCG o CACGAG, però també es poden unir a caixes E del grup B amb menys afinitat. Els tres tenen la característica de ser inhibidors actius de la transcripció i de presentar, a més del domini bHLH, dos dominis conservats: el domini *orange*, que els dona especificitat i un tetrapèptid conservat a l'extrem C-terminal, necessari i suficient per a permetre la seva interacció amb el co-repressor general Groucho. Aquest tetrapèptid és WRPW en el cas de la família HES, i YRPW per a la família HERP. Els homodímers de proteïnes del grup E reben el nom de repressors actius perquè regulen negativament l'expressió des seus gens diana, però el mecanisme sembla ser diferent entre ambdues famílies i es pensa que és dependent al context on es troben [61].

Finalment, el **grup F** inclou un subgrup de proteïnes les quals a part de contenir un domini HLH atípic, contenen una hèlix 2 duplicada i un domini COE (Collier/OLF1/EBF) que està involucrat en la dimerització i unió a DNA [62].

3.2. Neurogenina3

Neurogenina3/Atonal homolog 5 (Neurog3) pertany al grup A classe II de bHLH teixit específics, i està altament relacionada amb la proteïna proneural de *Drosophila* Atonal. S'expressa en el pàncrees embrionari, el tracte gastrointestinal i algunes regions del sistema nerviós en desenvolupament. Neurog3 es necessària per a la diferenciació endocrina del pàncrees. Totes les cèl·lules endocrines deriven d'un progenitor pancreàtic que ha expressat alts nivells de Neurog3 de forma transitòria [63]. La supressió genètica de Neurog3 en el ratolí resulta en una pèrdua gairebé completa de

cèl·lules endocrines i precursors de l'illot, fet que demostra un paper essencial i no redundat de Neurog3 en l'especificació del llinatge endocrí en el pàncrees [32]. El fet que la deficiència en Neurog3 causada per mutacions en el gen de la NEUROG3 provoqui diabetis neonatal o infantil confirma la importància d'aquest factor de transcripció en el desenvolupament i funció de les cèl·lules de l'illot en humans [64-66]. A més a més, estudis de guany de funció han demostrat que Neurog3 és suficient per iniciar la diferenciació endocrina en contextos cel·lulars permissius *in vivo* [67, 68] i també *in vitro* [69, 70]. Degut a tots els estudis realitzats amb Neurog3, ha estat catalogada com un gen de funció pro-endocrina. Addicionalment, Neurog3 també es requereix per a la formació de les cèl·lules endocrines de l'intestí i de l'estómac [71].

A pesar de la seva forta expressió durant el desenvolupament (fig.13), l'expressió de Neurog3 es perd quan els precursors endocrins es diferencien. Tot i això, nivells baixos són detectables en cèl·lules diferenciades després del naixement, fet que suggereix l'existència de papers addicionals de Neurog3 en la maduració i manteniment de la funció de l'illot [33].

Tot i la seva gran rellevància en la diferenciació endocrina, es coneix molt poc sobre els mecanismes moleculars que podent estar mediant aquesta activitat pro-endocrina. Neurog3 dimeritza amb E47 i estimula transcripcionalment l'expressió de les seves dianes gèniques, on entre les quals hi ha factors de diferenciació endocrina com el *NeuroD1*, *Pax4*, *Nkx2.2* o *Insm1*. I seguidament, aquests factors cooperen per portar a terme el programa de diferenciació endocrina iniciat per la pròpia Neurog3 [56]. No obstant, estudis genòmics de guany i pèrdua de funció han revelat que Neurog3 regula l'expressió d'una gran varietat de gens, entre els quals no només hi ha reguladors transcripcionals, sinó també reguladors d'una gran varietat de funcions cel·lulars [70, 72]. Però encara queda per esbrinar si aquests són dianes directes de Neurog3 o estan regulats per factors activats per aquesta.

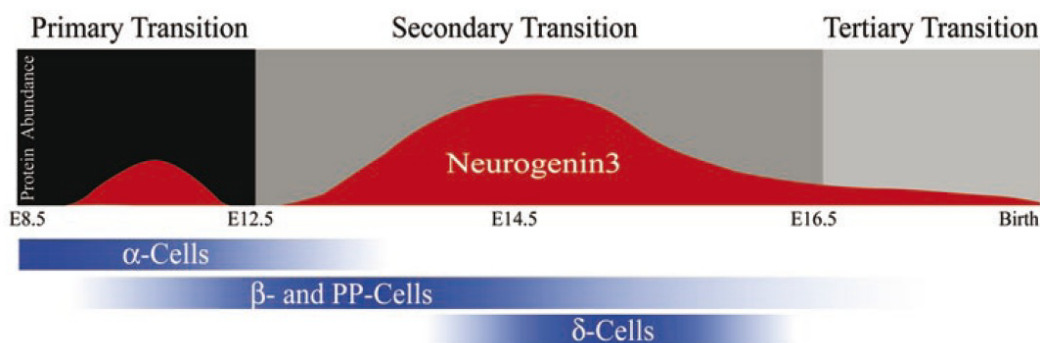


Figura 13. Diagrama de l'expressió de Neurog3 durant el desenvolupament del pàncrees del ratolí [73].

Estudis recents han posat de manifest que els nivells d'expressió de *Neurog3* són un pas limitant per assegurar el destí endocrí a partir dels progenitors pancreàtics. Baixos nivells de *Neurog3* en els precursors ocasiona que no esdevinguin cèl·lules endocrines, i aquestes mantenen certa plasticitat ha revertir cap a altres tipus cel·lulars (exocrí o ductal) [74]. Ja que *Neurog3* s'expressa en una finestra molt estreta de temps en els progenitors, la seva expressió ha de ser finament regulada per tal de garantir en primer lloc la seva inducció fins un llindar d'expressió adequat per iniciar el programa de diferenciació endocrina, i en segon lloc, la seva posterior repressió a mesura que el programa de diferenciació endocrina està activat. Diversos factors que són expressats en els progenitors pancreàtics poden transactivar el gen de *Neurog3* (*HNF6*, *Hnf1*, *Sox9* i *Pdx1*), per tant, estan involucrats en la seva inducció inicial. Però gairebé res més es coneix sobre el mecanisme que indueix la repressió de *Neurog3* en les cèl·lules endocrines diferenciades.

El mRNA de *Neurog3* està present en més cèl·lules que la seva proteïna [75], suggerint que la seva expressió està també regulada a nivell post-transcripcional. El *splicing* alternatiu ha estat proposat com un altre nivell de regulació [76]. A més a més, les neurogenines són unes proteïnes bastant inestables que poden ser poli-ubiquitinades per a la seva posterior degradació pel proteosoma. La unió amb el seu company E47 potencia la seva estabilització i acumulació quan la seva activitat és necessària [77]. En resum, és probable que diversos nivells de regulació, no només transcripcional i post-transcripcional sinó també epigenètic i nivells d'activitat, existeixin per garantir una expressió adequada de *Neurog3* i conseqüentment una massa i funció endocrina adequada en l'adultesa.

3.3. **NeuroD1**

NeuroD1 és també un factor bHLH del grup A classe II teixit específic molt proper filogenèticament i similar en seqüència a *Neurog3* que s'expressa en el sistema nerviós, el pàncrees i el tracte gastrointestinal. A diferència de *Neurog3*, *NeuroD1* està altament expressat en les cèl·lules β diferenciades, on funciona com a regulador clau de gens marcadors de la cèl·lula β com la insulina, el receptor de sulfonilurea 1 (*SUR1*) o el gen de la glucocinasa entre d'altres. Però no només es important per a la seva activació, sinó també per a la seva regulació enfront estímuls fisiològics com la glucosa. Les diferents associacions entre el *locus* de *NeuroD1* i la etiologia de diabetis en humans [78, 79] remarca la importància d'aquest factor de transcripció en la funció i desenvolupament de les cèl·lules del illot.

NeuroD1 és activat després de les proteïnes Neurogenina en desenvolupament neural i pancreàtic. La sobreexpressió de *Neurog3* en cèl·lules pancreàtiques i endocrines indueix l'expressió endògena

del gen de *NeuroD1*, i aquesta és mitjançada per la unió de *Neurog3* al seu promotor [34, 35, 80]. Degut a que l'expressió de *Neurog3* està molt disminuïda en les cèl·lules de l'illot, l'expressió de *NeuroD1* es deu mantenir per autoregulació [69] o per accions coordinades d'altres factors de transcripció presents en les cèl·lules β .

Estudis de guany de funció demostren que *NeuroD1*, a l'igual que *Neurog3*, pot actuar com a factor pro-endocrí tant en cèl·lules pancreàtiques com no pancreàtiques [81, 82]. Estudis genòmics d'expressió han revelat que ambdós factors regulen un grup important similar de gens, aportant les bases moleculars de la seva equivalència funcional. No obstant, existeixen diferències en quant a temps i nivells d'expressió d'algunes de les seves dianes gèniques que demostren com aquests dos factors no són completament redundants.

3.4. Math6

3.4.1. Descripció

El gen per al **Mouse Atonal Homolog 6 (Math6)**/Atonal homolog 8 (*Atoh8*) pertany a la mateixa família de bHLH que la *Neurogenina/NeuroD*, amb els quals manté un 43-57% de similitud en el domini bHLH. Amb els seus ortòlegs *Hath6* (humà) i *net* (*Drosophila*), comparteix el 100% del seu domini bHLH i, a més a més, s'ha demostrat importants rols de *net* durant el desenvolupament [83, 84]. Però a diferència d'altres factors de transcripció bHLH que durant en desenvolupament tenen una expressió tissular restringida i estan codificats per un sol exó, *Math6* s'expressa en una gran varietat de teixits en l'embrió i està format per 3 exons, indicant una estructura i funcionalitat úniques entre els seus homòlegs *atonals* (fig.14).

Math6 va ser descrit per primera vegada l'any 2001 quan es va suggerir la seva implicació en l'especificació i diferenciació de llinatges cel·lulars neuronals, afavorint la neurogènesi per sobre de la gliogènesi [85]. A més a més, també es va trobar la seva expressió en diferents subtipus neuronals adults, fet que indica un paper en el manteniment d'aquests subtipus cel·lulars addicionalment al seu paper en la determinació del destí neuronal. En el ratolí *Math6* també s'ha vist implicat a part del desenvolupament neural, en el desenvolupament del ronyó, del pàncrees, del fetge i més recentment en pollet i peix zebra en el desenvolupament de la retina i del múscul esquelètic [85-90].

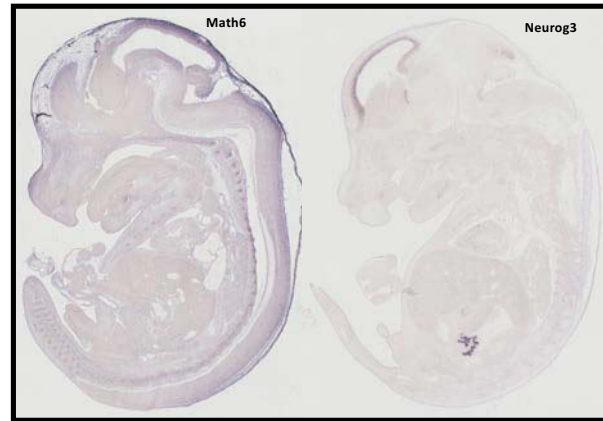


Figura 14. Fotos obtingudes per hibridació *in situ* al recurs web Gene Paint (www.genepaint.org) d'embrions de e14.5 dies de desenvolupament. El marcatge per Math6 té un perfil d'expressió global mentre que amb Neurog3 es veu un marcatge específic per pàncrees.

En el ronyó, Math6 és requerit per al manteniment dels podòcits, cèl·lules altament especialitzades essencials en el procés de filtració glomerular. La seva pèrdua produeix una des-diferenciació d'aquestes cèl·lules, la pèrdua del programa regulatori que manté el podòcit adult normal en un estat típicament quiescent i en un estat de diferenciació terminal.

Math6 també és expressat en la retina i somites del peix zebra, on el seu silenciament en etapes embrionàries produeix malformacions severes, indicat per una morfologia anòmala i una reducció gènica de marcadors específics de retina i múscul esquelètic.

Un altre estudi revela que Cath6 (homòleg de pollet) inhibeix la diferenciació neuronal en la retina durant el desenvolupament. Específicament s'expressa en la mateixa regió que Notch1, Cash1 i Cath5, marcadors de cèl·lules progenitores, progenitors pre-neurogènics i neurones naixents just abans de la diferenciació terminal, respectivament, i és necessari per mantenir aquest tipus cel·lular indiferenciat. La unió de Cath6 al DNA és essencial per portar a terme aquesta funció.

Totes les dades obtingudes fins ara suggereixen que Math6 té un paper rellevant en el desenvolupament dels òrgans on s'expressa. La letalitat temprana d'embrions murins gen-anul·lats per Math6 indica el requeriment d'aquest gen en estadis inicials de l'embriogènesi [87]. A més a més, Math6 té un patró d'expressió ampli i dinàmic en l'embrió el que suggereix funcions addicionals d'aquest factor en morfogènesi i diferenciació de teixits (fig.15 A). Per tant, Math6 participa en el procés de diferenciació de diferents òrgans, i de fet, altres factors bHLH específics de teixit, tenen la capacitat de regular l'expressió de Math6 *in vitro* [87, 91].

3.4.2. Math6 i pàncrees

Math6 va ser identificat com a diana de Neurog3 emprant microarrays d'expressió en cèl·lules ductals pancreàtiques (mPAC) on s'havia expressat de manera ectòpica Neurog3 [34]. Punt de partida per al nostre grup en l'estudi d'aquest desconegut factor en el pàncrees. El nostre grup ha mostrat que Math6 és un component de la xarxa transcripcional embrionària del pàncrees i, que s'expressa tant en el compartiment endocrí com exocrí en diferenciació, però que és feblement expressat en l'òrgan madur (fig.15 B) [87]. Addicionalment, altres estudis del nostre grup confirmen que Math6 és una diana directa de Neurog3. De fet, Math6 és una diana dels factors Neurog3 i Ptf1a, el que explicaria la seva presència en els dos compartiments pancreàtics. En base a estudis en models cel·lulars, Math6 podria tenir un paper regulador de l'activitat pro-endocrina de Neurog3 contrarestant els efectes inductors de Neurog3 sobre gens proendocrins *in vitro*. Com he dit abans, Math6 en el pollet funciona com un regulador negatiu de la diferenciació, suggerint un rol possiblement repressor de Math6 allí on s'expressi. Però el paper que desenvolupa Math6 durant el procés de diferenciació endocrina del pàncrees *in vivo* és objecte d'estudi del nostre grup i d'aquesta tesi doctoral.

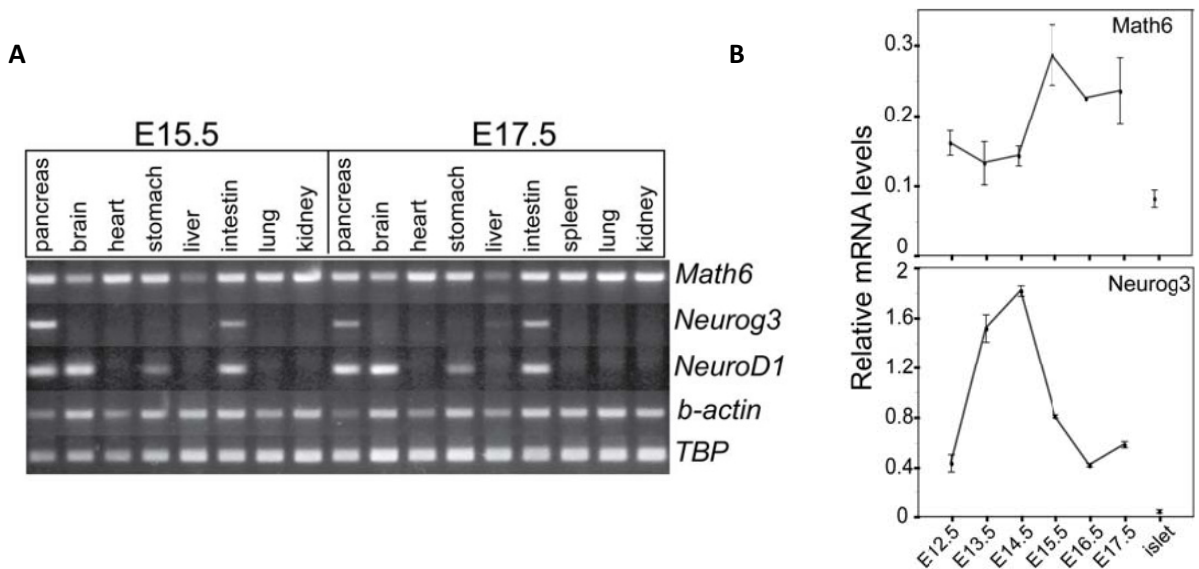


Figura 15. A) Expressió del mRNA de Math6 en diferents teixits de ratolí en etapa embrionària. **B)** Nivells relatius de Math6 i Neurog3 en primordis pancreàtics de l'edat indicada analitzats per PCR a temps real i expressat en relació al gen control mGUS [87].

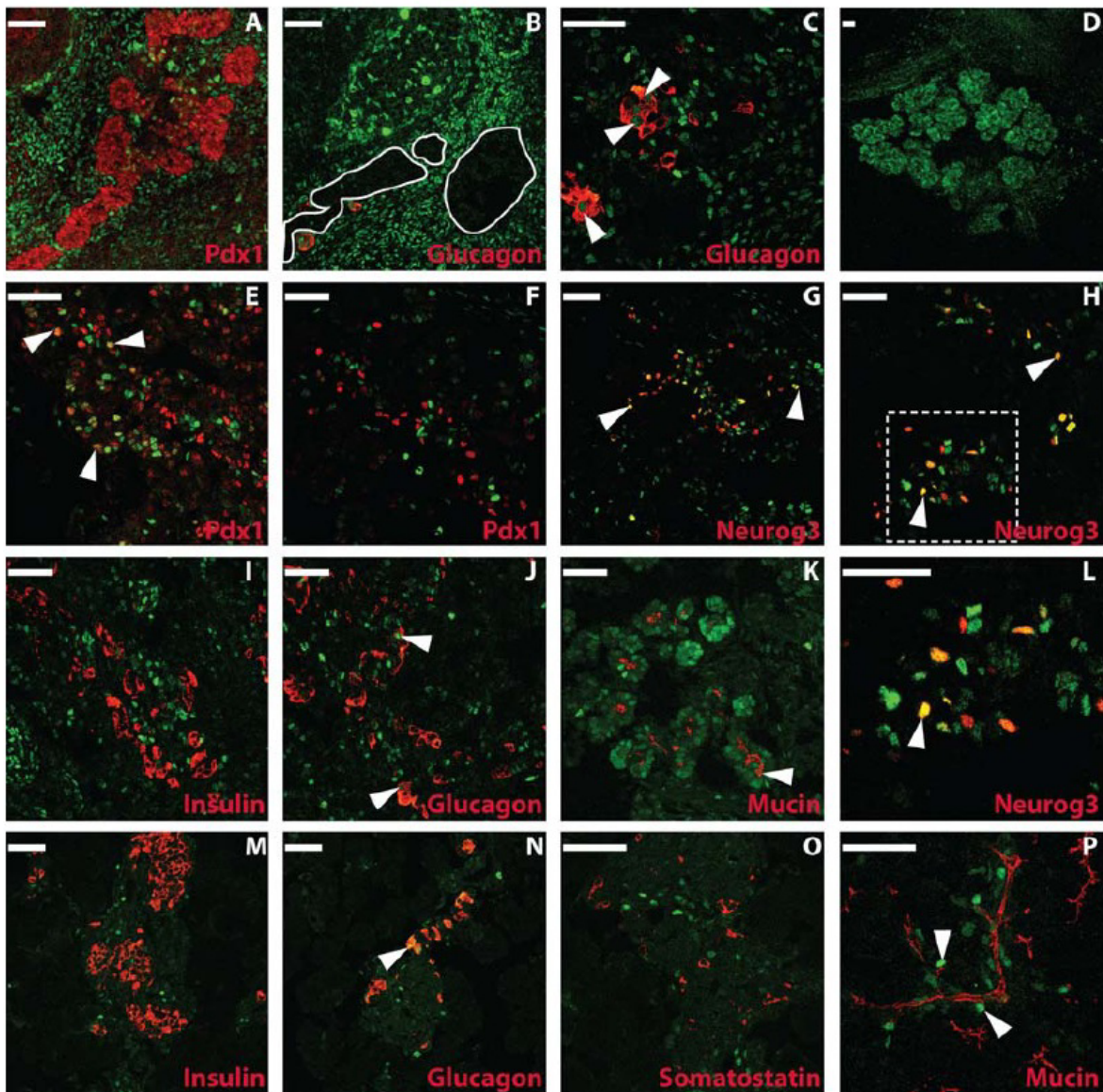


Figura 16. Expressió de GFP en els pàncrees dels ratolins *Math6* $+/eGFP-Cre$. Tinció GFP (*Math6*) en verd sol (D) amb Pdx1 (roig; A, E, F), Neurog3 (roig; G, H, L), glucagó (roig; B, C, J, N), insulina (roig; I, M), somatostatina (roig; O) i mucina1 (roig; K, P) a e12.5 (A-C), e14.5 (D), e15.5 (E-L) i e17.5 (M-P) [87].

L'expressió temporal de *Math6* durant el desenvolupament pancreàtic reflexa un perfil similar al de Neurog3, es pot detectar del e12.5 al 17.5 dia de desenvolupament, i la seva expressió disminueix fins nivells baixos en l'òrgan madur (fig.15 B). El mRNA de *Math6* arriba a un pic màxim el e15.5, un dia després que Neurog3.

En el pàncrees en desenvolupament es va poder identificar la població de cèl·lules *Math6* positives gràcies a la utilització d'un ratolí Knock-in eGFP-Cre (a falta d'anticossos per aquest factor) heterozigot (el cassette eGFP-Cre es troba substituint els exons 1 i 2 d'un dels al·lels del *locus Math6*).

A e12.5 es pot localitzar Math6 exclòs de l'epiteli pancreàtic, el qual està marcat per Pdx1. No obstant, hi ha tinció en les cèl·lules inicials glucagó positives i en el mesènquima que envolta l'epiteli més primerenc (fig.16 A-C). Al e15.5 l'expressió de GFP apareix en cèl·lules de l'epiteli pancreàtic (fig.16 E-L). El nombre de cèl·lules progenitores Neurog3 positives es troben en un punt àlgid entre el e14.5 i el e15.5, i és llavors quan es va estimar que el 50% de les cèl·lules Neurog3 també expressen eGFP (Math6) (Fig.16 G,H i L). També s'ha observat co-expressió amb els marcadors temprans de diferenciació Nkx2.2 i Nkx6.1 (dades no publicades). A l'igual que l'observa't en la figura 15, els nivells de Math6 disminueixen progressivament a partir del e15.5, a e18.5 les cèl·lules GFP positives no expressen insulina ni somatostatina, però si coexpressen glucagó o mucina1, un marcador de cèl·lules ductals (fig.16 M-P).

Com a estratègia complementària als models animals, es va realitzar una aproximació *in vitro* de guany de funció emprant la línia cel·lular mPAC, on es va demostrar que Math6 per ell sol no pot promoure el programa de diferenciació endocrina com fa la pròpia Neurog3, però en canvi pot modular en cert grau la seva funció pro-endocrina de Neurog3. A més a més, utilitzant estratègies de gen reporter, s'ha vist com Math6 té una activitat intrínseca repressora que explicaria la repressió de Neurog3 i algunes de les seves dianes.

4. CICLE CEL·LULAR I DESENVOLUPAMENT PANCREÀTIC

4.1. El cicle cel·lular

El cicle cel·lular es un conjunt de processos seqüencials que condueixen al creixement cel·lular, la replicació del genoma i la divisió en dues cèl·lules filles, iguals entre si i amb la cèl·lula mare. És crucial en el desenvolupament i creixement dels organismes pluricel·lulars, així com en els processos de renovació i reparació tissular dels òrgans. El cicle està altament regulat, per a que les cèl·lules puguin progressar d'una fase a la següent han d'haver completat la fase prèvia amb èxit.

4.1.1. Fases del cicle cel·lular

El cicle cel·lular eucariota està format per quatre fases (fig.17):

- **Fase G1** (Interval 1): També coneguda com interfase. És la primera fase del cicle i transcorre entre la formació de les cèl·lules filles i el inici de la replicació del DNA. Es caracteritza per un creixement cel·lular produït per la síntesi de RNA, proteïnes i per la proliferació dels orgànuls citoplasmàtics.
- **Fase S** (Síntesi): És la fase on es replica el DNA. És una de les fases més crítiques del cicle donat que la informació genètica s'ha de mantenir amb la màxima fidelitat. Cada cromosoma es replicat donant lloc a dos cromàtides germanes idèntiques unides pel centròmer.
- **Fase G2** (Interval 2): En aquest període les cèl·lules es preparen per dividir-se, en conseqüència es torna a produir una gran activitat de síntesi proteica per poder entrar, progressar i sortir de la mitosi. Durant G2 es verifica la correcta replicació del genoma i es reparen els errors.
- **Fase M** (Mitosi): Es produeix la condensació dels cromosomes i la seva segregació de manera equitativa, així com el procés de citocinesi a partir del qual la cèl·lula progenitora divideix el seu citoplasma. Ambdós processos tenen com a resultat la formació de dos cèl·lules filles iguals entre si.

La fase M consta de les següents etapes:

Profase: S'inicia amb el desacoblament de l'embolcall nuclear. La cromatina replicada es condensa gràcies als complexos condensina generant els cromosomes. Els microtúbuls del citoesquelet cel·lular es polimeritzen i comencen a formar el fus mitòtic.

Prometafase: Complexos proteics s'uneixen als centròmers formant els cinetòcors, a partir dels quals els cromosomes interaccionen amb els microtúbuls del fus.

Metafase: Els microtúbuls del fus exerceixen tensió sobre els cromosomes que es disposen alineats en el plànol equatorial de la cèl·lula. Els microtúbuls es troben ancorats als pols cel·lulars mitjançant els centrosomes.

Anafase: Els cinetòcors es separen i en conseqüència, cada cromàtide germana es segrega a un pol cel·lular per la tensió exercida pels centrosomes.

Telofase: Les cromàtides germanes arriben als pols cel·lulars i es comencen a descondensar. Es reacobra l'embolcall nuclear i el fus mitòtic es despolimeritza.

Citocinesi: Es dona el repartiment del citoplasma entre les cèl·lules filles. En cèl·lules animals es produeix per estrangulació de la membrana cel·lular per l'anell contràctil format per filaments d'actina. Com a resultat d'aquest procés es formen dues cèl·lules filles.

- **Fase G₀:** És el període en que les cèl·lules estan en estat quiescent, és a dir, que es troben en estat de repòs del cicle cel·lular, tot i que continuen mantenint les seves funcions bàsiques. Les cèl·lules poden entrar en G₀ per diferents motius: falta de factors de creixement, per diferenciació (es donen en organismes pluricel·lulars quan les cèl·lules s'especialitzen en funcions determinades) o per inducció a partir del *checkpoint* de fase G₁, on s'engloba la senescència replicativa. Durant aquest període es desmantella la maquinaria del cicle cel·lular, i les ciclines i Cdk son degradades. No obstant això, l'estat quiescent es reversible, les cèl·lules poden ser estimulades per entrar novament en cicle entrant en fase G₁.

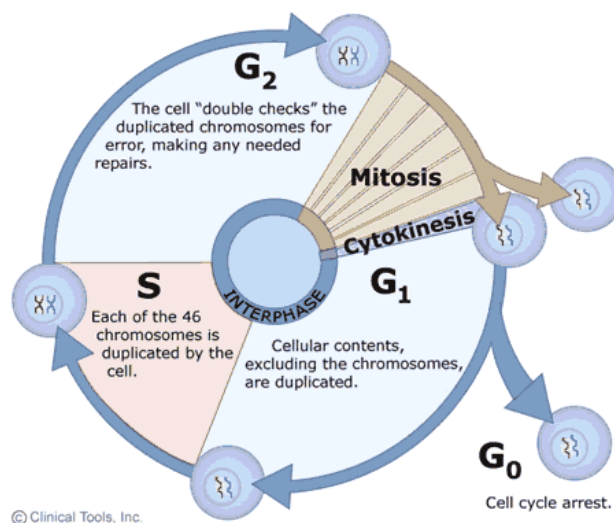


Figura 17. Cicle cel·lular eucariota (Copyright © Clinical Tools, Inc.)

Les fase S i M són les més controlades del cicle cel·lular, ja que són clau per mantenir l'estabilitat genòmica i evitar el desenvolupament de processos tumorals en organismes pluricel·lulars.

4.1.2. Control del cicle cel·lular

El cicle cel·lular està regulat per diferents complexos, els més destacats són 1) ciclines-Cdk (*Cyclin-dependent Kinase*), encarregats de conduir a les cèl·lules de forma ordenada a través de les diferents fases, 2) els complexos ubiquitina lligases i 3) els mecanismes de control o *checkpoints*.

Complexos Ciclina-Cdk

Els complexos Ciclina-Cdk regulen la progressió al llarg del cicle cel·lular. Per dur a terme la seva funció les dues subunitats han d'interaccionar. Les ciclines van ser descobertes originàriament per Tim Hunt com proteïnes que presentaven oscil·lacions en els seus nivells d'expressió al llarg del cicle cel·lular [92]. Actualment es defineixen com a membres d'una superfamília amb similituds estructurals que uneixen i activen les subunitats catalítiques de la família de cinases Cdk a través del domini caixa ciclina, per tant formen la subunitat reguladora del complex [93]. Cada fase del cicle es caracteritza per l'expressió de diferents tipus de ciclina, permetent així la regulació diferencial de les Cdk. Cada ciclina es pot unir a una o dues subunitats catalítiques regulant l'activitat cinasa i conferint diferents especificitats. Existeixen diferents tipus de ciclines que regulen funcions tant diverses com el control del cicle cel·lular, la transcripció, la diferenciació i el *splicing* alternatiu.

Les ciclines de cicle cel·lular s'agrupen en quatre grups: ciclines de fase G1 (ciclines D), de fase S (ciclines E i A) i ciclines mitòtiques (ciclines A i B). Les funcions de les ciclines van lligades a les oscil·lacions dels seus nivells al llarg del cicle cel·lular que venen reflectides per l'abundància dels seus mRNA, així com per la seva destrucció guiada pels complexos ubiquitina lligases [94] (fig.17). Actualment es pensa que l'especificitat de substrat dels complexos ciclina-Cdk ve donada bàsicament pel moment d'expressió de cada ciclina i la seva localització, determinant l'activació espai-temporal de cada complex [95]. Les Cdk són les subunitats catalítiques del complex, presenten activitat cinasa de Serina/Treonina (Ser/Thr) i són capaces d'unir-se i ser activades per les ciclines.

Les Cdk formen una família extensa, es poden trobar els seus membres al llarg de tota l'escala filogenètica, des dels llevats fins mamífers superiors, presentant una gran homologia. Així en *S. pombe* i *S. cerevisiae* només es troba una subunitat cdk (Cdc2p i Cdc28p respectivament) que s'unirà a les diferents ciclines, en eucariotes superiors les funcions de les Cdk de cicle cel·lular es troben repartides i especialitzades en diferents membres de la família. Les Cdk es sintetitzen en un estat

basal d'inactivitat i no s'activen fins que s'uneixen a la seva ciclina corresponent pel motiu PSTAIRE que es altament conservat entre els membres de la família. En forma monomèrica les Cdk presenten un domini anomenat *T-loop* que bloqueja el centre actiu (domini cinasa) mantenint-les inactives [96].

Una altra característica de les Cdk es que presenten un temps de vida mitja elevat, mentre que les ciclins presenten una vida mitja molt més curta. Les Cdk, igual que les ciclins, es poden classificar segons la fase del cicle en que actuen, d'aquesta manera tenim les cinases de fase G1, Cdk4 i 6 (uneixen a les ciclins de la família D), de fase S, Cdk2 (que s'acomplexen amb les ciclins E i A) i de mitosi, Cdk1 (s'uneix tant amb les ciclins A com a les B) (fig.18).

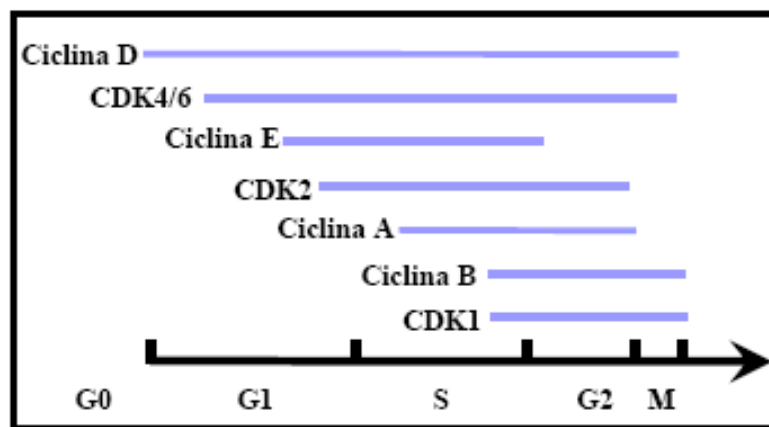


Figura 18. Patró d'expressió de les ciclins i activitats Cdk al llarg del cicle cel·lular. Cdk2 pot ser activada per ciclina E i A, mentre que Cdk1 per ciclina A i B. Figura modificada de [97].

Activació-Inhibició del complex Ciclina-Cdk

Tant les ciclins com les Cdk estan subjectes a modificacions post-traduccionals per fosforilacions que permeten l'activació i la modulació del complex. El primer esdeveniment necessari per l'activació del complex es l'assemblatge entre una Cdk i la seva ciclina respectiva. Aquesta unió es produeix entre la caixa ciclina de les ciclins i el motiu PSTAIRE de les Cdk, provocant un canvi conformacional de la subunitat catalítica de forma que el *T-loop* deixa lliure el domini cinasa i passa a interaccionar amb la ciclina. L'assemblatge del complex condueix a una activació parcial de la subunitat catalítica. L'activació completa es produeix per la fosforilació d'un residu treonina crític del domini *T-loop* de totes les subunitats catalítiques que el presenten.

Un cop les ciclins han completat la seva funció són degradades per a que les cèl·lules puguin continuar progressant al llarg del cicle. Principalment es degraden per dues vies: 1) Desfosforilació del residu treonina activador. La desfosforilació d'aquests residus provoca la separació de les dues subunitats afavorint la degradació de la ciclina [98]. 2) Fosforilació dels residus Treonina14 i Tirosina15 a la regió N-terminal de les Cdk, concretament a la regió d'ancoratge de l'ATP utilitzat pel

domini cinasa. Aquesta regió canvia la seva conformació impossibilitant la interacció amb l'ATP [99]. Aquestes fosforilacions inhibidores requereixen la unió prèvia de la subunitat ciclina. Fins l'actualitat no es coneix amb seguretat quines son les cinases responsables. Les candidates proposades son les cinases Wee1 i Myt1. La desfosforilació activadora dels residus Thr14 i Tyr15 és controlada pels membres de la família de fosfatases Cdc25 [100]. Aquestes fosfatases juguen un paper important en l'aturada del cicle cel·lular generat per l'activació dels mecanismes *checkpoint* en resposta a dany en el DNA.

Inhibidors de les Cdk (CKI)

Un altre mecanisme de regulació dels complexos ciclina-Cdk és la interacció amb pèptids inhibidors de les Cdk. S'han descrit dues famílies de proteïnes inhibidores segons la seva evolució, estructura i especificitat envers les Cdk: la **INK4** (*inhibitor Cdk4*) i la **Cip/Kip**. La família INK4 consta de quatre membres: p16 INK4a, p15 INK4b, p18 INK4c i p19 INK4d [101-103], tots ells s'uneixen a les cinases Cdk4 i Cdk6, interferint en l'associació amb les ciclins de la família D. L'acció dels membres d'aquesta família sobre les seves dianes provoca una aturada en G1, ja que evita que les proteïnes de la família retinoblastoma siguin fosforilades i, en conseqüència, els factors de transcripció E2F romanen segrestats, inhibint així la transcripció de les proteïnes necessàries per superar la transició G1/S i la progressió per la fase S.

Els membres de la família Cip/Kip presenten un ampli espectre d'acció, afectant els complexos de ciclina D, E, A i B amb les seves respectives Cdk. Es caracteritzen perquè poden unir-se tant a les ciclins com a les subunitats catalítiques per inhibir el complex. Provocant un canvi conformacional en el domini actiu de les Cdk, evitant així que interaccionin amb les seves dianes. Aquesta família es formada per p21 (Cip1/Waf1/Sdi1), p27 (Kip1) i p57 (Kip2) [104-106].

Ubiquitina lligases

Els complexos ubiquitina lligasa formen el sistema més important per la degradació de components del cicle cel·lular, esdeveniment imprescindible per la progressió al llarg del cicle. Hi han dos complexos estructuralment similars que porten a terme aquesta funció, són els complexos E3 ubiquitina lligasa (fig.19).

- **Complex Skp-Cullin-F-Box (SCF)**
- **Anaphase-Promoting Complex (APC)**

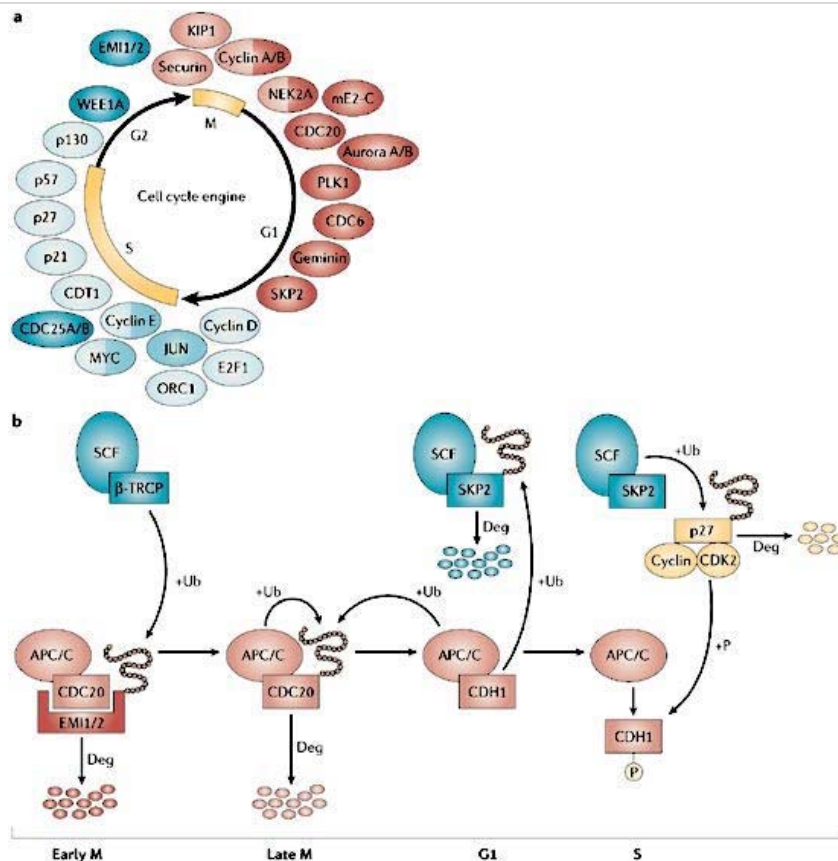


Figura 19. A) Esquema dels diferents components reguladors durant les diferents fases del cicle cel·lular. **B)** Fronteres entre les activitats dels complexos SCF i APC, i entre les diferents subunitats, les quals estan governades per interaccions positives i negatives entre elles [107].

Els complexos E3, són els encarregats de reconèixer proteïnes específiques, treballen conjuntament amb l'enzim E1 que activa el grup ubiquitina i el transfereix a l'enzim E2, aquest finalment transferirà el grup a la proteïna diana. Les proteïnes ubiquitinades són reconegudes i degradades pel proteosoma.

El **complex SCF** exerceix la seva funció des del final de la fase G1 i al llarg de tota la fase S, inactivant-se al principi de la fase G2. El seu nucli està format per les proteïnes Skp1 (*S-phase kinase-associated protein 1*), Cdc34 (*cell division cycle 34 homolog*) i Cul1 (*Cullin 1*) [108]. L'especificitat en el reconeixement de les dianes del complex ve donada per l'existència d'un gran nombre de factors que s'activen i interaccionen amb el complex en moments concrets del cicle, aquests factors formen una família proteica caracteritzada per la presència de dominis caixa-F, domini crucial en la interacció amb el nucli de SCF a través de Skp1 [109].

El **complex APC** esdevé totalment actiu a la metafase, regulant així la transició i progressió per la fase M. La seva especificitat envers les seves dianes ve donada pels factors Cdc20 (*cell division cycle 20*

homolog) i Cdh1 (cadherin1) que es caracteritzen per la presència de dominis WD40 [110]. En aquest cas els dominis WD40 serveixen per reconèixer les caixes de destrucció de les proteïnes diana. APC regula la ubiquitinització de diferents proteïnes al llarg de la fase M, com per exemple marca per destrucció les ciclines A durant la prometafase i les ciclines B en la metafase, totes dues controlades pel factor Cdc20, acció imprescindible per a que les cèl·lules puguin completar la fase M del cicle [111].

4.1.3. Mecanismes de vigilància del cicle cel·lular

El cicle cel·lular es troba ordenat en processos moleculars seqüencials que depenen els uns dels altres, és a dir, que la iniciació dels esdeveniments tardans depèn del correcte compliment dels esdeveniments més primerencs. El desenvolupament normal d'aquests processos seqüencials al llarg del cicle cel·lular es troba altament regulat pels mecanismes coneguts com a mecanismes de vigilància o *checkpoints* [112].

Els *checkpoints* asseguren la correcta progressió de les cèl·lules al llarg de les diferents fases del cicle amb l'objectiu de mantenir la viabilitat cel·lular i la integritat genòmica. Quan detecten errors d'algun tipus s'activen, generant la resposta del checkpoint, que engloba l'aturada del cicle cel·lular i l'activació dels mecanismes adients de reparació. Si l'error es repara la cèl·lula prossegueix el cicle. Si per contra, l'error no es corregit, els *checkpoints* indueixen la mort per apoptosi o la senescència replicativa. Tradicionalment els *checkpoints* s'han dividit en quatre mecanismes de vigilància:

- Mecanisme de vigilància anterior a la replicació (transició G1/S). Avaluja la capacitat de les cèl·lules de dur a terme i completar la replicació del genoma. Per fer-ho, monitoritza la mida cel·lular, la disposició de nutrients i de factors de creixement i, finalment, avalua el dany cel·lular en el DNA.
- Mecanisme de vigilància durant el procés de replicació (fase S). Monitoritza el procés de síntesi de DNA testant activament l'estat del procés i preservant la integritat genòmica.
- Mecanisme de vigilància posterior a la replicació (fase G2). Avaluja la correcta i total replicació del genoma. També determina la capacitat de la cèl·lula per completar el repartiment dels cromosomes replicats i la duplicació cel·lular durant la mitosi.
- Mecanisme de vigilància de la divisió cel·lular (fase M). Controla la segregació equitativa dels cromosomes replicats en les cèl·lules filles, controlant la síntesi dels centròmers, la polimerització i la tensió del fus mitòtic i l'alineament dels cromosomes.

L'activació d'aquests sistemes de control en condicions d'estrès cel·lular evita la presència de lesions en el DNA per a que no es fixin en el moment de la replicació, alhora que inhibeix la segregació mitòtica de cromosomes danyats en fase M. Les mutacions dels elements que intervenen en aquestes vies provoquen inestabilitat genòmica i són àmpliament representades en els càncers humans [113].

4.2. Regulació del cicle cel·lular durant el desenvolupament

El desenvolupament d'organismes multicel·lulars depèn de la generació de cèl·lules en un nombre apropiat i l'adquisició en el temps adequat de les seves funcions d'especialització. Habitualment, el procés d'especialització ocorre a través de diverses rondes de divisió, on el punt final esdevindrà al adquirir un estat no divisor de cèl·lula especialitzada. La decisió de dividir-se o diferenciar-se està controlat en part per senyals externs com situació espacial, factors de creixement, mitògens i morfògens. No obstant, les respostes específiques davant aquest tipus de senyals depenen de la informació intrínseca de la pròpia cèl·lula, la qual inclou la presència de factors de transcripció i modificacions a nivell de cromatina [114]. Però hem de tenir en compte que l'estat de cèl·lula terminalment diferenciada no és incompatible amb reemprendre la divisió cel·lular una altra vegada [115].

A pesar dels esforços realitzats en els últims anys, encara ha de ser determinat com un grup de reguladors del cicle cel·lular està vinculat amb l'inici de procés de diferenciació i, com el procés de desenvolupament dona lloc al control del cicle cel·lular i l'homeòstasi dels diferents teixits en diferents situacions de desenvolupament. Les diferents vies de senyalització poden controlar l'expressió de gens de cicle cel·lular i diferenciació, però resta per explorar el possible intercanvi d'informació (crosstalk) entre aquests dos processos.

4.2.1 *Coordinació de la sortida de cicle amb la diferenciació terminal*

La coordinació de la diferenciació terminal amb una sortida permanent de cicle és crucial per a una correcta organogènesi. Tot i això, es desconeix com les cèl·lules surten de cicle durant un desenvolupament normal, o mantenen un estat no-proliferatiu en l'adultesa. Abans de la diferenciació terminal, les cèl·lules responen a senyals proliferatius, incloent aquells que promouen la proliferació abans de la diferenciació. Els models actuals de sortida de cicle s'acullen a la repressió de l'activitat Ciclina/Cdk per les ciclines dependents de cinases (CKI), o la repressió de l'eix E2F pels membres de la família Retinoblastoma (Rb), com els mecanismes proximals pels quals la progressió del cicle s'atura (fig.20) [116].

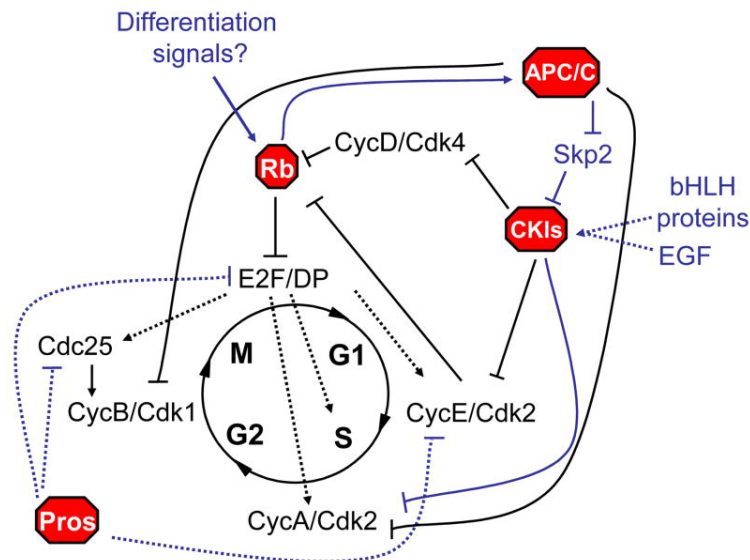


Figura 20. Senyals moleculars de parada. Els reguladors negatius del cicle cel·lular funcionen com bloquejants, prevenint la proliferació fins la correcta diferenciació terminal. Alguns dels senyals identificats són la família de factors Retinoblastoma i les ciclines depenent de cinases, també s'han identificat com a reguladors negatius el factor de transcripció Propero-like homeobox (Pros) i el paper postmitòtic del Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C). La regulació es pot donar a nivell transcripcional (línies discontinües) o post-transcripcional (línies sòlides) [116].

Com les senyals de desenvolupament desencadenen la diferenciació cel·lular vulnerant la regulació del cicle cel·lular, és una qüestió que encara no té resposta. Una dels exemples més ben caracteritzats és la regulació dels factors Cip/kip de la família de CKI (p21, p27 i p57) per factors bHLH. Cip/Kip CKI s'expressen de forma coordinada en el temps i en l'espai en la diferenciació terminal i el inici de la sortida de cicle. Alguns exemples de bHLH són MyoD o Hes1 que regulen l'expressió dels factors Cip/Kip *in vivo* i *in vitro* [50, 117].

En la literatura trobem un altre exemple recent de la connexió entre la maquinaria de cicle cel·lular i la diferenciació. L'habilitat de Neurog2, un factor bHLH de la família de les Neurogenines, d'induir diferenciació neuronal augmenta gradualment a mida que es perd la fosforilació de residus que són diana de les Cdk (quantitativament el nombre de residus fosforilats depenen dels nivells d'activitat de Cdk). Conseqüentment a mesura que la G1 s'allarga i l'activitat Cdk disminueix, Neurog2 esdevé gradualment hipofosforilada, resultant en l'expressió de NeuroD i portant cap al procés de diferenciació [118].

4.2.2 Proteïnes del cicle cel·lular en el desenvolupament pancreàtic i la diferenciació endocrina

Les cèl·lules β pancreàtiques han estat descrites des de fa molt de temps com unes cèl·lules totalment diferenciades amb una baixa taxa de proliferació, tot i així, la seva proliferació juga un paper clau en el manteniment i funció de la massa de cèl·lula β . En els últims anys ha crescut l'interès en conèixer al detall els mecanismes moleculars que controlen el cicle cel·lular d'aquestes valuoses

cèl·lules, ja que serà clau per al desenvolupament de noves estratègies per a la producció de cèl·lules productores d'insulina. La taula 4 mostra el resum d'algunes d'aquestes molècules que de forma no intencionada es va veure que la seva pèrdua produïa un fenotip en les cèl·lules β , provinent sempre d'estudis generals del control del cicle cel·lular durant processos cancerosos o durant el desenvolupament.

FACTORS	FENOTIP PANCREÀTIC MODEL MUTANT DE RATOLÍ
E2F1	Tenen el creixement pancreàtic, la massa i funció de la cèl·lula β danyada [119]
E2F2	El doble mutant E2F1/E2F2 desenvolupa diabetis i una insuficiència pancreàtica exocrina [120]
pRB	No presenta fenotip pancreàtic, però en combinació amb el silenciament de p53, el animals desenvolupen hiperplàsia de l'illot i insulinoma [121, 122]
Cdk4	Tenen diabetis ocasionada per una manca de cèl·lules insulina positives [123]
Ciclina D2	Essencial per al creixement post-natal de la cèl·lula β . Els ratolins desenvolupen intolerància a la glucosa [124, 125]
p21	No presenta fenotip pancreàtic [126]
p27	Fenotip pancreàtic limitat, però en combinació amb p18 desenvolupen hiperplàsia de l'illot i insulinoma [127]
p53	Desenvolupament de tumors endocrins [122]

Taula 4. Molècules del cicle cel·lular i els seus fenotip en el pàncrees del ratolí.

Encara que els reguladors de cicle cel·lular de la proliferació de la cèl·lula β adulta estan relativament ben caracteritzats, què ocorre durant el desenvolupament embrionari del pàncrees resta gairebé tot per desxifrar.

La sortida de cicle cel·lular concomitant al inici de la diferenciació ocorre durant la fase G1 i és un procés comú en el desenvolupament d'òrgans. En quant al pàncrees, com aquest procés és coordinat i mantingut durant el transcurs de la diferenciació es desconeix encara a hores d'ara. El 2006 va ser descrit el paper de p57 en la regulació de la sortida de cicle dels progenitors durant etapes tempranes de la formació del pàncrees [50]. L'inhibidor de la Cdk p57 és una diana directa del repressor transcripcional de la via Notch Hes1. Així, la inactivació de Hes1 produeix un increment de p57 en els progenitors pancreàtics (PPM), produint una aturada de cicle dels mateixos, una diferenciació precoç i una reducció del grup de progenitors. El doble mutant per p57 i Hes1 mostra

una recuperació del fenotip i l'expansió del primordi pancreàtic, demostrant que aquest dos factors coordinen la decisió binària del progenitor pancreàtic a sortir del cicle cel·lular o continuar expandint-se.

Ja en etapes més avançades del desenvolupament i basat en la poca bibliografia que existeix al respecte, hom considera que la majoria de les cèl·lules Neurog3+ es troben en un estat quiescent, doncs són negatives pels marcadors de proliferació BrdU, Ki67 o Ph3 [128, 129] (Fig.21). L'explicació molecular que s'ha establert per aquesta observació és que Neurog3 activa el gen diana NeuroD1 i aquest provoca la sortida de cicle mitjançant un augment de l'expressió de p21. Aquest augment permetrà la sortida de cicle i la diferenciació terminal de les cèl·lules endocrines [30, 129]. Tot i que més recentment s'ha postulat que aquest augment en p21 podria venir donat directament per la unió de la pròpia Neurog3 al promotor de p21 [130].

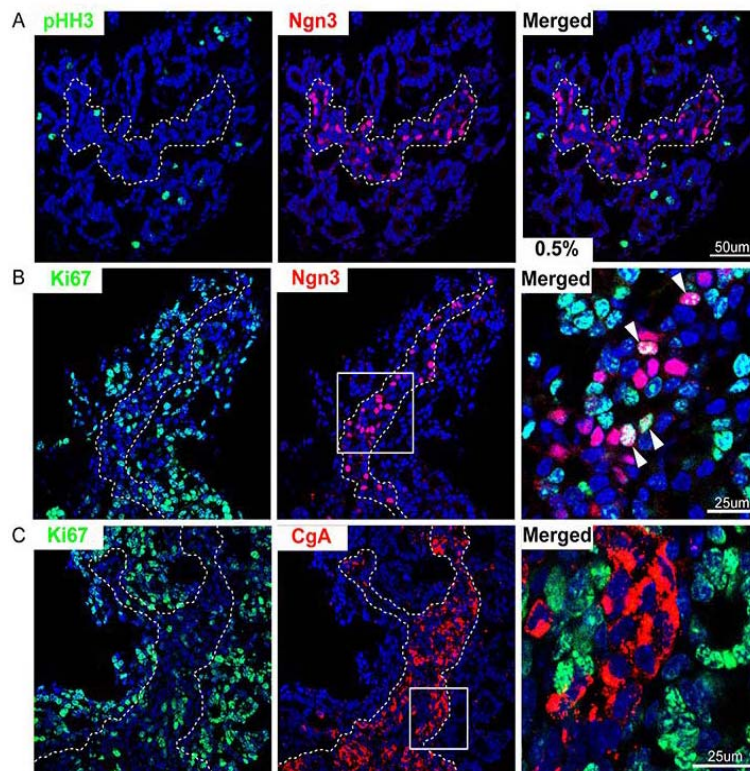


Figura 21. La majoria de cèl·lules Neurog3+ es troben en un estat quiescent. Fotografies d'un pàncrees a e15.5 revelen que **A)** el 0,5% de cèl·lules Neurog3+ són Ph3+. **B)** La majoria de cèl·lules Ki67+ es troben al mesènquima o ja estan diferenciades cap a un llinatge exocrí. **C)** La majoria de cèl·lules endocrines marcades per chromograninaA són Ki67-, els acinis en creixement són Ki67+ [129].

El regulador p21 és activat per la via Notch i moltes altres vies de senyalització, i és un factor necessari per a la determinació irreversible cap a la diferenciació. Per tant, el fet que es necessiti p21 per induir la sortida de cicle en una gran varietat de contextos cel·lulars de desenvolupament, reflexa

la integració de diferents senyals en el seu promotor. Tot i la gran importància d'aquesta proteïna en el procés de diferenciació terminal, sorprenentment s'ha vist que p21 no és essencial ni per la diferenciació endocrina durant l'embriogènesi ni per a la funció de la cèl·lula β *in vivo* [126]. De quina manera la seva absència pot quedar compensada per altres proteïnes de similar funció no està clar.

Un estudi recent en el qual s'ha caracteritzat l'expressió de gens de cicle en progenitors Neurog3+ i els seus descendents demostra que l'expressió de Neurog3 produeix un bloqueig en l'entrada a la fase S, fent que el progenitor endocrí es quedi en un estat quiescent i així pugui iniciar el procés de diferenciació. És en aquest moment quan altres reguladors negatius de la progressió del cicle cel·lular a part del p21 augmenten la seva expressió, destacant p27, Trp53 i Rb1. Mentre que s'observa una disminució dels reguladors positius com la Ccnb2, Ccnd2, Cdk6, Cdc25, i del marcador de proliferació Ki67 [130]. Una vegada determinat el llinatge, la disminució de l'expressió de Neurog3 és crítica ja que permetrà la reentrada de les cèl·lules al cicle cel·lular. Per tant el patró d'expressió de Neurog3 juga un paper crític en determinar la mida de la població de cèl·lules β , l'estructura funcional del pàncrees madur i el risc a desenvolupar diabetis.

A més a més, també s'ha vist la gran importància de Cdk4 durant el desenvolupament pancreàtic. Aquesta cinasa dirigeix el desenvolupament endocrí influenciant la proliferació dels progenitors Pdx1+ i promovent la expansió dels precursors endocrins durant l'embriogènesi via la regulació de l'expressió de Neurog3 mitjançada pel factor E2f1 [131]. La deficiència de Cdk4 redueix la mida del pàncrees en desenvolupament degut a un dèficit en el desenvolupament del mesènquima i menys nombre de cèl·lules progenitores Pdx1+. De forma contrària, el model animal que conté una forma activada de Cdk4 (Cdk4^{R24C}), produeix un increment del nombre de cèl·lules Neurog3+, resultant en una expansió del llinatge β . E2F1 s'uneix i activa el promotor de Neurog3 modulant els seus nivells d'expressió d'una manera Cdk4 dependent.

4.2.3 Manteniment de la sortida de cicle: Canvis a nivell de cromatina

Estudis en la caracterització dels complexos entre les famílies Rb i E2F sobre el DNA han fet possible la identificació d'un gran nombre d'interaccions amb factors remodeladors de la cromatina que poden contribuir a la repressió de gens E2F-dependents. Entre aquests hi ha els complexos que inclouen deacetilases d'histones (HDAC), l'associació amb el remodelador de nucleosomes dependent d'ATP SWI/SNF i les histona metil-transferases (HMT). Totes aquestes associacions suggereixen un mecanisme molt obvi pel qual els gens E2F-dependents poden ser reprimits de forma estable pels membres de la família Rb (Rb, p107 i p130) per a la sortida de cicle. No obstant, es desconeix quin

tipus d'unions són funcionalment rellevants per a la repressió de gens de cicle en la diferenciació terminal.

L'impacte fenotípic del tractament amb inhibidors de HDAC (HDACi) durant la diferenciació exocrina i endocrina va demostrar el paper d'aquest enzims durant aquest procés [132]. El resultat va ser una disminució dramàtica en la diferenciació acinar, un augment de la diferenciació ductal i un augment també en el nombre de progenitors Neurog3+. L'expressió de les HDAC es veu disminuïda durant la diferenciació pancreàtica, amb un augment associat de l'acetilació d'histones des de l'estadi embrionari fins l'adulthood en el desenvolupament pancreàtic.

El paper dual dels reguladors de cicle en la diferenciació terminal no ha deixat clar per el moment si poden ser dos esdeveniments per separat. La resposta a aquesta pregunta sembla ser específic per a cada teixit, degut a que la funció dels diferents reguladors en la progressió del cicle cel·lular i la diferenciació terminal són cèl·lula específics. Encara queda molta feina per fer.

II. OBJECTIUS

Math6/Atoh8 és un factor de transcripció bHLH molt poc conegut. Els estudis disponibles indiquen que participa en diversos programes de diferenciació cel·lular durant el desenvolupament, però la seva funció concreta es desconeix. En el pàncrees, Math6 s'expressa en cèl·lules endocrines en diferenciació i desapareix de les cèl·lules madures. El gen de *Math6* es activa directament pel gen pro-endocrí *Neurog3* i Math6 pot modular negativament les funcions pro-endocrines de *Neurog3 in vitro*.

En base a totes aquestes dades prèvies, hipotetitzem que **Math6 participarà en etapes inicials del programa de diferenciació endocrina promogut per Neurog3**. Aquesta tesi té com a objectiu general investigar quina és la funció concreta de Math6 en el programa de diferenciació endocrino-pancreàtica. En última instància, aquests estudis ampliaran el nostre coneixement sobre la cascada transcripcional pancreàtica durant l'embriogènesi.

Els objectius concrets d'aquesta tesi són:

Objectiu 1. Caracterització bioquímica de l'activitat transcripcional de Math6

Hem estudiat la capacitat de Math6 per transactivar caixes E canòniques, hem caracteritzat els seus dominis funcionals i hem investigat el seu possible mecanisme d'acció com a factor de transcripció.

Objectiu 2. Identificació dels gens regulats per Math6 en un model cel·lular de diferenciació endocrina

Hem emprat dues estratègies alternatives i complementàries: una de **pèrdua de funció** i un altra de **guany de funció de Math6** en un model cel·lular de diferenciació endocrina. Hem estudiat els perfils globals d'expressió gènica en resposta a aquestes manipulacions mitjançant microarrays d'expressió amb la finalitat de identificar gens diana i vies/funcions potencialment regulades per Math6.

Objectiu 3. Caracterització del fenotip pancreàtic en un model murí gen-anul·lat per Math6 específic de pàncrees

Hem generat un model de ratolí portador de llocs loxP flanquejant l'exó1 del gen de Math6. Hem creat un model Math6 gen-anul·lat específic de pàncrees mitjançant el creuament d'aquests ratolins amb ratolins transgènics Pdx1-Cre i hem caracteritzat el fenotip de desenvolupament i la funció pancreàtica d'aquest model.

III. MATERIALS I MÈTODES

1. LÍNIES CEL·LULARS

1.1 Manteniment de les línies cel·lulars

LÍNIA CEL·LULAR	MEDI DE CULTIU	SUPLEMENTS
mPAC: línia cel·lular pancreàtica ductal de ratolí	Dulbecco's Modified Eagles Medium (D-MEM) 4500mg/L de glucosa (Sigma-Aldrich)	<ul style="list-style-type: none"> • 10% FBS (Fetal Bovine Serum, (GibcoBRL) • 1%penicil·lina/estreptomicina (100U/ml, Cambrex)
HEK293: línia cel·lular embrionària de ronyó humana	Dulbecco's Modified Eagles Medium (D-MEM) 4500mg/L de glucosa (Sigma-Aldrich)	<ul style="list-style-type: none"> • 10% FBS (Fetal Bovine Serum, (GibcoBRL) • 1%penicil·lina/estreptomicina (100U/ml, Cambrex)
NIH3T3: línia cel·lular fibroblàstica de ratolí	Dulbecco's Modified Eagles Medium (D-MEM) 4500mg/L de glucosa (Sigma-Aldrich)	<ul style="list-style-type: none"> • 10% FCS (Fetal Calf Serum, (GibcoBRL) • 1%penicil·lina/estreptomicina (100U/ml, Cambrex)

Taula 5. Línies cel·lulars i medis de cultiu utilitzats durant la tesi.

1.1.1. Tripsinització i comptatge

Totes les línies cel·lulars utilitzades són adherents i creixen en monocapa. De manera general es passen una o dues vegades per setmana a una ràtio de 1:10 quan provenen d'un flascó de 75cm².

Protocol (flascó de 75cm²):

1. Aspirar el medi de cultiu
2. Afegir 10ml de DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (Sigma-Aldrich)
3. Aspirar el DPBS
4. Afegir 1ml de tripsina (Invitrogen)
5. Incubar 5 min a 37°C
6. Afegir 9ml de medi complet i pipetejar per desenganxar les cèl·lules (en el cas que sigui necessari)
7. Mesclar 1:1 de cèl·lules amb blau tripà (Invitrogen) que permet quantificar la viabilitat cel·lular, ja que el blau tripà només penetra dins de les cèl·lules mortes
8. Comptar les cèl·lules amb el comptador cel·lular (The Countess™ Automated Cell Counter, Invitrogen)
9. Agafar 1ml (ràtio 1:10) o 2ml (ràtio 1:5) i resuspendre en 10 ml de medi complet

1.1.2. Criopreservació de cèl·lules

Protocol (flascó de 75cm²):

1. Després de tripsinitzar les cèl·lules, centrifugar-les entre 1000-1500rpm 5min
2. Resuspendre-les en FBS (GibcoBRL) amb un 10% de DMSO (Sigma-Aldrich)
3. Repartir el volum de cèl·lules preparat en criotubs (depenen de la concentració de cèl·lules inicial)
4. Congelar criotubs a -80°C utilitzant el tanc de isopropanol (NALGENE™), que baixa la temperatura 1°C/min

1.1.3. Descongelació de cèl·lules

Protocol (flascó de 75cm²):

1. Descongelar el criotub lentament
2. Diluir el contingut del criotub en medi complet i afegir al flascó de 25cm² o 75 cm² depenen de la quantitat inicial de cèl·lules congelades
3. Guardar a l'incubador a 37°C i l'endemà fer un canvi de medi per treure les restes de DMSO

1.2 Assajos duals de luciferasa

Els sistemes reporters consistents en un seqüència promotora seguida pel gen de la luciferasa (*luc*) permeten l'estudi de les seqüències reguladores de la transcripció eucariota. Es realitza una transfecció transitòria en cèl·lules en cultiu i es poden detectar els efectes transcripcionals sobre el gen *luc* mesurant els nivells d'activitat luciferasa de la cuca de la llum (*Photinus pyralis*). Com a control de l'eficiència de la transfecció, fem vectors reporter amb el gen *luc* de l'espècie *Renilla reniformis* sota el control de promotor d'activitat alta i constitutiva com CMV (d'aquí la nomenclatura "dual"). L'activitat luciferasa és pràcticament absent en les cèl·lules de mamífer, de manera que la luminescència detectada en els lisats cel·lulars és directament proporcional a l'activitat promotora de la construcció transfectada.

1.2.1. Transfeccions transitòries

Els mètodes de transfecció utilitzats en aquesta tesi per a realitzar els assajos luciferasa van ser diferents segons les cèl·lules utilitzades:

1.2.1.1. Cèl·lules mPAC

Protocol (placa de 96 pouets):

1. Plantar 15000cèl·lules/pouet 24h abans de la transfecció
2. Fer la barreja dels vectors reporters segons procedeixi: pG5FLpro (alta activitat) o pG5FLE1B (baixa activitat) Gal4 dependent (150ng/pou), E1X3-TATA (per als reporters caixes E) (150ng/pou) i pRL-CMV (2,5ng/pou)
3. Incloure els vectors d'expressió corresponents: PM2(Gal4), PM2-Math6 i els diferents constructes, PM2-E47, pCMVTnt-flag.Neurog3, pCMVTnt-myc.Math6, pCMV-HA-E47, pCMV-Mash1 a 10ng/pou
4. Afegir a la barreja 25µl/pou de DPBS
5. Barrejar el Metafectene PRO (Biontex) a 0,5µl/pou, pipetejant una única vegada
6. Deixar incubant la barreja a temperatura ambient durant 30-40min
7. Afegir la barreja als pous corresponents i deixar 48h a 37°C
8. Procedir a l'anàlisi de l'activitat luciferasa

1.2.1.2. Cèl·lules NIH3T3

Protocol (placa de 96 pouets):

1. Plantar 15000cèl·lules/pouet 24h abans de la transfecció
2. Fer la barreja dels vectors reporters segons procedeixi: pG5FLpro (alta activitat) o pG5FLE1B (baixa activitat) Gal4 dependent (150ng/pou), E1X3-TATA (per als reporters caixes E) (150ng/pou) i pRL-CMV (2,5ng/pou)
3. Incloure els vectors d'expressió corresponents: PM2(Gal4), PM2-Math6 i els diferents constructes, PM3-E47, pCMVTnt-FLAG-Neurog3, pCMVTnt-myc-Math6, pCMV-HA-E47, pCMV-Mash1 a 10ng/pou
4. Afegir a la barreja 50µl/pou de medi sense complementar (sense FBS ni P/S)
5. Barrejar el Transfast (Promega) a 0,5µl/pou, fent un vòrtex d'uns 3-5 segons
6. Deixar incubant la barreja a temperatura ambient durant 20min
7. Treure el medi de les cèl·lules i afegir la barreja als pous corresponents i deixar 2h a 37°C
8. Afegir 150µl/pou de medi complementat i deixar 24h a 37°C
9. Procedir a l'anàlisi de l'activitat luciferasa

1.2.2. Determinació d'activitat Luciferasa en cèl·lules transfectades

Vam mesurar les activitats luciferasa de Photinus i Renilla a les cèl·lules transfectades utilitzant el kit comercial Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega), seguint les instruccions de la casa comercial. Les mesures de luminescència es van realitzar en un luminòmetre Veritas de placa de 96 pous (Turner Biosystems). Les dues activitats es poden llegir a partir del mateix lisat cel·lular degut a requeriments enzimàtics diferents.

Protocol (placa de 96 pouets):

1. Lisem les cèl·lules amb 25µl de tampó de lisi passiu 1X (*Passive Lysis Buffer*) (Promega) per pou
2. Deixem la placa en agitació a temperatura ambient durant 15-20min i congelem les mostres a -20°C per tal d'ajudar a la lisi cel·lular
3. Descongelem mostres i reactius
4. Preparam els reactius per mesurar les activitat luciferasa de Photinus i Renilla seguint instruccions de la casa comercial: Luciferase Assay Buffer II i Stop&Glo Buffer que barrejarem amb el Stop&Glo Substrate (50X), respectivament
5. Carreguem en una placa de 96pous 10µl de cada mostra i procedim a la lectura en el luminòmetre, el qual injectarà 25µl/pou del reactiu de Photinus primer i de Renilla després. Mesurem l'emissió de llum durant 10 segons en cada cas. Obtindrem els valors de luciferasa de Photinus pyralis (representativa de l'activitat del promotor o de la regió promotora estudiada) i de Renilla reniformis (control intern de transfecció)

1.3. Proliferació cel·lular

Per mesurar la proliferació de les cèl·lules mPAC sotmeses a diferents condicions s'ha emprat el kit comercial Cell Proliferation ELISA BrdU colorimètric (Roche) per mesurar la incorporació de BrdU (Bromodeoxyuridina) durant la síntesi de DNA o replicació de les cèl·lules.

Protocol (placa de 96 pouets):

1. Plantem 6000 cèl·lules/ pou 24h abans de la infecció
2. Infectem amb les diferents dosis de virus que volem estudiar (Ad.CMV-shMath6, Ad.CMV-Neurog3 o Ad.CMV-shControl) per quadruplicat cada condició
3. Afegim el BrdU al medi de cultiu 5h abans de la mesura de la proliferació (a les 19h i 43h després de la infecció)
4. Mesurem la incorporació de BrdU a les 24 i 48h post-infecció seguint les instruccions del fabricant del kit comercial: fixem les cèl·lules, incubem amb un anticòs anti-BrdU conjugat a peroxidasa (anti-BrdU-POD) i mitjançant una reacció colorimètrica de reacció del substrat quantifiquem la incorporació de BrdU per espectrofotometria (450nm)

1.4. Estudi de la distribució cel·lular en les diferents fases del cicle

1.4.1. Tinció amb iodur de propidi i citometria de flux

La tinció de DNA amb iodur de propidi requereix condicionament de les cèl·lules (permeabilització) previ al marcatge. El iodur de propidi s'uneix tant a DNA com a RNA, de manera que haurem de tractar les cèl·lules amb Ribonucleasa A. El iodur de propidi s'excita a 536 nm (llum visible) i emet a 617 nm. D'aquesta forma podem mesurar el contingut de DNA de les cèl·lules individualitzades i la seva grandària i saber en quina fase del cicle es troben.

Protocol (placa de 10 cm):

1. Plantem $2 \cdot 10^6$ cèl·lules/ pou 24h abans de la infecció
2. Infectem amb els diferents virus que volem estudiar (Ad.CMV-shMath6, Ad.CMV-Neurog3, Ad.CMV- β gal o Ad.CMV-shControl) per quadruplicat cada condició
3. A les 24 o 48h (2 temps diferents d'estudi) iniciem el procés primerament amb la tripsinització i comptatge de les cèl·lules
4. Les rentem dues vegades amb PBS i resuspenem en 0,9 ml de PBS (mínim un milió per condició d'estudi)
5. Permeabilitzem les cèl·lules afegint 2,1 ml d'etanol absolut (a -20°C) gota a gota mentre la suspensió cel·lular s'agita suaument (concentració final d'etanol 70%)
6. Mantenim les cèl·lules 30min a -20°C (Les cèl·lules permeabilitzades poden guardar-se varies setmanes a 4°C)
7. Rentem dues vegades amb PBS fred centrifugant a màxima velocitat per eliminar l'etanol
8. Tinció: Resuspenem les cèl·lules en 1 ml de Solució d'Anàlisi acabada de preparar
9. Incubem els tubs 30min a 37°C o bé tota la nit a 4°C
10. Adquirim i analitzem per citometria de flux (BD FACSCalibur)

Solucions i productes emprats:

- Iodur de Propidi: Molecular Probes (P-1304)
- Ribonucleasa A: (Sigma R-5503)
- Solució de PBS amb EDTA 5 mM
- Solució A: Citrat sòdic 38 mM
Iodur de propidi 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Solució B: Ribonucleasa A (Sigma R-5503) 10 mg/mL
- Solució d'anàlisi (Per cada mL de solució d'anàlisi):
940 μL de PBS
30 μL de solució A
30 μL de solució

1.4.2. Tinció amb Ph3 i citometria de flux

La tinció combinada amb un anticòs anti-fosfo-histona3 (Ph3) i iodur de propidi permet discriminar i quantificar les cèl·lules que es troben en les fase G2 i M del cicle cel·lular (Ph3 marca específicament cèl·lules en mitosi).

Protocol (placa de 10 cm):

1. Seguim pas del 1 al 7 del protocol de l'apartat anterior de la tinció amb iodur de propidi
2. Permeabilitzem (II) les cèl·lules per segona vegada amb una solució del 0,2% de Tritó en un volum final de 3 ml durant 15 min en gel
3. Bloqueig amb una solució del 2% de FBS durant 30 min a temperatura ambient
4. Posem l'anticòs primari per Ph3 (millipore) en un volum de 100 μL 1h a temperatura ambient a una dilució 1:400
5. Afegim 3 ml de PBS i rentem
6. Afegim l'anticòs secundari (alexa fluor 488) a una dilució 1:500 durant 30 min a temperatura ambient
7. Afegim 3 ml de PBS i rentem
8. Tinció: Resuspenem les cèl·lules en 1 ml de Solució d'Anàlisi acabada de preparar
9. Incubem els tubs 30min a 37°C
10. Adquirim i analitzem per citometria de flux (BD FACSCalibur)

Productes emprats:

- Etanol 100% (vol/vol)
- Tritó 0,2% (vol/vol)
- Fetal bovine serum (FBS)
- anti-Ph3 Ser10 (Millipore)
- anti-conill Alexa Fluor 488 (invitrogen)
- Iodur de Propidi: Molecular Probes (P-1304)
- Ribonucleasa A: (Sigma R-5503)
- Solució de PBS amb EDTA 5 mM

2. VECTORS D'EXPRESSIONI

2.1. Generació de vectors d'expressió

Per a la realització de molts dels experiments d'aquesta tesi, s'han hagut de generar vectors plasmídics específics que ens han permès sobreexpressar o silenciar gens, crear adenovirus etc. A continuació, mostrem primer les passes/metodologies generals que hem seguit per a la construcció d'aquests vectors i en segon lloc el llistat dels vectors generats seguint aquests procediments.

2.1.1. Amplificació per a la clonació de gens

2.1.1.1. Expand High Fidelity PCR System

Aquest kit distribuït per Roche conté una mescla de polimerases, on una d'elles *proofreading*, ens assegura que el transcrit amplificat no contingui mutacions.

Protocol:

1. Afegir en un tub lliure de RNases i DNases:

Mescla de dNTPs a 10mM.....	1µl
Mescla d'encebadors a 10µM.....	2µl
Tampó de reacció de High Fidelity amb MgCl ₂ 15mM 10x.....	5µl
DNA.....	2µl
Expand High Fidelity enzyme mix.....	0,75µl (2,6U)
H ₂ O destil·lada.....	39,25µl

2. Mesclar amb la pipeta i centrifugar breument

3. Introduir al termociclador en aquestes condicions:

94°C-----	2min
10 cicles de:	
94°C-----	15s
55°C-----	30s
72°C-----	1min (la fase d'extensió depèn de la longitud del transcrit, 1Kb/1min)
25 cicles de:	
94°C-----	15s
55°C-----	30s
72°C-----	1min + 5s per cada cicle
72°C-----	7min
4°C-----	∞

2.1.2. Clonació de fragments de PCR

Per a la clonació de fragment de PCR es va emprar el kit pGEM-T Easy Vector System (Promega), que permet aprofitar la característica dels fragments de PCR que presenten extrems protuberants 3' amb una adenina. Teòricament amb el kit *Roche Expand High Fidelity PCR System* els extrems no presenten aquesta característica degut a l'activitat de la polimerasa *proofreading* (pfu), però a la pràctica també poden ser clonats d'aquesta forma sense afegir adenines en l'extrem 3' perquè el kit conté en realitat una combinació de polimerases, no només la pfu.

Aquest kit conté un vector pGEM-T Easy que està obert i presenta extrems protuberants 3' amb una timidina, fet que permet la seva no recircularització i que es puguin lligar els fragments que es volen

clonar. A més a més, el lloc d'obertura d'aquest vector, és al mig del gen *LacZ* que codifica per a la β -galactosidasa. Quan es clona satisfactòriament un gen, es crea un gen aberrant de *LacZ* i no es produeix l'expressió d'una β -galactosidasa funcional. D'aquesta manera se'ns facilita la selecció de clons que expressen el vector amb el nostre fragment d'interès.

El que construïm és un vector intermedi per poder transferir després el nostre cDNA d'interès a diferents vectors d'expressió.

Protocol:

1. Afegir en un tub:

Vector pGEMT-easy	0,5 μ l
Insert producte PCR	1/2 μ l
Tampó de lligació ràpida 2x	5 μ l
T4 DNA ligasa	1 μ l (3U)
H ₂ O destil·lada	fins 10 μ l
2. Deixar la preparació a 16°C durant 16 hores

2.1.3. Digestió de vectors

A través del mapa del vector o plasmidi, s'han de localitzar els llocs on volem que els enzims de restricció actuïn, d'aquesta manera podrem alliberar els fragments d'interès o obrir un plasmidi per poder afegir una regió d'interès. Els enzims de restricció van ser adquirits a New England Biolabs i van acompanyats dels reactius necessaris per al procés de digestió.

Per realitzar digestions múltiples, haurem d'observar les compatibilitats dels enzims i els seus tampons corresponents per escollir el de més rendiment. Si no són compatibles, la digestió s'haurà de fer de forma seqüencial. Altres aspectes a tenir en compte a l'hora de seleccionar un enzim de restricció és que tingui *star activity* (activitat estrella), on en algunes condicions pot reconèixer seqüències diferents a les predeterminades, o que la digestió sigui inhibida per la presència de grups metil (introduïts per metiltransferases presents en certes soques bacterianes).

Protocol (orientatiu):

1. Afegir en un tub:

Plasmidi per digerir	1-2 μ g
Tampó 10x	2 μ l
BSA (si fos necessari) 10x	2 μ l
Enzim de restricció	1 μ l
H ₂ O destil·lada	fins 20 μ l
2. Incubar la mostra a 37°C durant 2 hores

2.1.4. Separació de transcrits en agarosa

Els gels d'agarosa permeten separar les amplificacions realitzades per PCR segons la seva mida, o els productes d'una digestió com és el nostre cas d'interès. En funció del percentatge d'agarosa que continguin, les bandes migraran a diferents velocitats. D'aquesta manera un gel amb un percentatge

elevat d'agarosa (3%) s'utilitza per separar bandes d'una mida inferior a 200pb (parells de bases), mentre que un gel de percentatge baix (0,5%) és per observar bandes d'una mida superior a 1kb.

De forma rutinària, excepte per casos concrets, es sol utilitzar un gel a l'1.5% que no es trenca amb facilitat i permet una bona observació de les bandes.

Preparació d'un gel d'agarosa (gel petit de 50ml a l'1%):

1. Afegir en un erlenmeyer de vidre:
 - Solució TAE (Tris, acètic i EDTA) 1x50ml
 - Agarosa (Sigma)0,5g
2. Escalfar al microones fins que l'agarosa es dissolgui
3. Deixar que es refredi una mica sense que s'iniciï la polimerització i afegir 2,5µl de Midori Green DNA Stain (NIPPON Genetics)
4. Traspasar la preparació a una safata de polimerització i deixar solidificar amb una pinta per formar els pouets
5. Una vegada solidificat, retirar la pinta i col·locar la safata en una cubeta amb tampó TAE 1x
6. Carreguem un marcador de pes molecular (que ens permet tenir una referència del pes de les bandes observades) i a continuació carreguem les mostres. En alguns casos haurem d'afegir tampó de càrrega blau/taronja 6x
7. Sotmetem el gel a una potència d'uns 80-110V, fins que el front avanci suficientment per poder distingir les bandes i observar-les amb un transil·luminador de llum ultraviolada

Solucions utilitzades:

Tampó TAE 50x

Tris(hidroximetil)aminometà (Serva)	242g
Àcid acètic glacial (Panreac)	57,1ml
Na ₂ EDTA.2H ₂ O (Sigma).....	37,2g
H ₂ O destil·lada	1L

2.1.5. Purificació de bandes d'agarosa

Una vegada es realitza la clonació d'un gen o la digestió d'un vector, ens pot interessar aïllar-lo. Per fer-ho, ho correm tot en un gel d'agarosa i amb l'ajuda d'un transil·luminador i un bisturí, aïllem la banda d'interès. A continuació necessitem extreure l'agarosa i purificar la mostra, i per a tal propòsit utilitzem el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), que es basa en un sistema de columnes amb resines de sílica-gel on s'uneix el DNA de 70pb a 10kb.

Protocol:

1. Introduir la mostra aïllada del gel en un tub i pesar-la. El pes màxim que es pot processar per columna és de 400mg d'agarosa
2. Afegir el tampó QG en una proporció 1:3 (per exemple a una mostra de 100mg haurem d'afegir 300µl de tampó)
3. Escalfar el tub a 50°C durant 10min o fins que l'agarosa es dissolgui
4. Afegir un volum de isopropanol (en referència al pes inicial) i homogeneïtzar
5. Traspasar el contingut a una columna QIAquick (volum màxim de 750µl; en cas de superar-lo, repetir els passos 5 i 6)
6. Centrifugar a màxima velocitat durant 1min
7. Descartar el líquid que ha passat a través de la columna
8. Afegir a la columna 750 µl de tampó PE i incubar 2-5min
9. Centrifugar a màxima velocitat durant 1min
10. Descartar el líquid que ha passat a través de la columna
11. Centrifugar a màxima velocitat durant 1min
12. Descartar el possible líquid que hagi passat per la columna i canviar el tub receptor de l'eluent
13. Afegir 30µl de tampó d'elució al centre de la membrana, deixar-ho durant 1min
14. Centrifugar a màxima velocitat durant 1min
15. Recollir l'eluent i valorar la seva concentració per espectrofotometria o Nanodrop (Thermo scientific)

2.1.6. Lligació de fragments

Després d'obrir el vector i tenir el fragment (insert) també digerit i tots dos purificats (el que volem introduir al vector), es procedeix a la lligació d'ambdós.

Per saber la quantitat de vector i fragment que necessitem utilitzarem la següent fórmula:

$$\text{Insert}(ng) = \frac{\text{insert}(pb) \times \text{Vector}(ng)}{\text{vector}(pb)} \times \text{insert : vector Ratio Molar}$$

La quantitat normalment emprada de vector és sobre uns 30 ng. El ràtio molar més baix a emprar és de 1 per vector i 3 per l'insert.

Protocol:

- Afegir al tub de 0.5 ml:
 - Vector tallat i purificat30ng
 - Insert tallat i purificat.....Xng
 - Tampó de lligació 5x2µl
 - T4 DNA ligasa (5 U) (Invitrogen).....1µl
 - H₂O destil·lada fins 10µl
- Deixar la preparació a 16°C durant 16 hores

2.1.7. Transformació de bacteris competents

Per amplificar els vectors s'han utilitzat bacteris competents *E.coli* DH-5α (Invitrogen), bacteris SCS110 (Stratagene) deficients per dues metilases (Dam i Dcm) o bacteris casolans.

Protocol:

- Descongela en gel l'aliquota de bacteris (30-50µl)
- Prop d'una flama, afegir el vector lligat o el que es desitja amplificar (en cas de les lligacions, una tercera part del volum la lligació; en cas d'un vector uns 10ng)
- Deixar 30min en gel
- Xoc tèrmic posant el tub a 42°C durant 1min
- Deixar 2min en gel
- Afegir 1ml de LB (*lysogeny broth*) sense antibiòtic i incubar en agitació a 37°C durant 1h
- Centrifugar 4min a 2.000rpm (només per a les lligacions)
- Aspirar sobrenedant i deixar només uns 150µl de LB amb bacteris
- Plaquer a una placa de LB agar amb ampicil·lina (en el cas de vectors amb el gen *LacZ* també X-gal) estenent tot el volum fins la seva completa absorció
- Deixar a 37°C durant unes 12-18h (tota la nit)
- Evitar deixar créixer en excés per la possible aparició de colònies satèl·lit (bacteris aliens a l'experiment que creixen en llocs on s'ha esgotat l'antibiòtic per l'actuació dels bacteris que hem sembrat)

Solucions utilitzades:

LB (Luria-Bertani medium)

- Afegir a una proveta (per fer 0,5 litres):
 - Bacto-triptona (Becton Dickinson).....5g
 - Bacto yeast extract (Becton Dickinson)2,5g
 - NaCl (Serva)5g
 - H₂O destil·lada fins 500ml
- Ajustar el pH a 7.4 amb una solució de NaOH
- Autoclavar per esterilitzar

LB agar

- Afegir:
 - LB sense autoclavar500ml

- Bacto-agar (Becton Dickinson).....7,5g
2. Autoclavar per esterilitzar
 3. Quan es refredi (sense que arribi a polimeritzar) afegir ampil·lina (Normon) a una concentració final de 100µg/ml
 4. Prop de la flama, traspasar el LB agar sense polimeritzar a plaques de Petri (Soria Genlab) i deixar refredar fins la seva completa polimerització
 5. Conservar les plaques a 4°C

LB agar – X-gal/IPTG

1. A les plaques anteriors, abans de sembrar s'ha d'afegir i estendre fins a la seva total absorció: 25µl X-gal (Promega) (50µg/µl) i 10µl d'IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) (357mM) (Amersham)

2.1.8. Amplificació (Creixement de bacteris en medi líquid)

Una vegada sembrats els bacteris en un medi sòlid com el LB agar, es procedeix a la seva selecció i pesca. Amb una punta estèril i prop d'una flama, es toca una única colònia. Seguint prop de la flama aquesta punta es diposita a l'interior d'un tub d'assaig estèril de 12ml amb tap (Falcon) que conté 3 ml de LB amb ampil·lina (100µg/ml).

Deixem créixer el cultiu bacterià durant aproximadament 12-16h (tota la nit), on obtindrem un caldo de cultiu tèrbol, el que vulgarment anomenaríem “minicultiu”. Si desitgem amplificar més el cultiu, traspasarem part del minicultiu (dilució de 1/500 a 1/1000) en un ambient estèril a una ampolla o erlenmeyer estèril que contingui 100ml LB ampil·lina (midiprep) o més de 150ml (maxiprep).

2.1.9. Purificació de plasmidis bacterians

2.1.9.1. A petita escala o processament de minipreps

Hem emprat un mètode de columnes de sílica gel per aïllar els plasmidis (Attend Bio).

Protocol:

1. Centrifugar 1,5ml de brou de cultiu durant 2min a 12.000rpm
2. Treure el sobrenedant i afegir al pèl·let de bacteris 100µl de solució I, deixar 1min (conté DNasa)
3. Afegir 200µl de solució II, homogeneïtzar bé i incubar 1min
4. Afegir 350µl de solució III, homogeneïtzar la mescla i incubar 1min
5. Centrifugar durant 5min a 12.000rpm
6. Transferir el sobrenedant a la columna
7. Centrifugar durant 2min a 10.000rpm
8. Afegir 500µl de solució de rentat
9. Centrifugar durant 2min a 10.000rpm
10. Repetir els passos 8 i 9
11. Centrifugar durant 1min a 8.000rpm per extreure de la columna restes líquides
12. Afegir 35µl de solució EB (elution buffer) al centre de la columna i incubar durant 2min
13. Canviar el tub recol·lector
14. Centrifugar durant 2min a 10.000rpm
15. Quantificació de la mostra

2.1.9.2. A mitjana (Midiprep) o gran escala (Maxiprep)

Per a la purificació de volums superiors es va emprar el kit de Qiagen Plasmid maxi o midi.

Protocol:

1. Centrifugar 150ml de maxi en tubs de 50ml a 6000g, durant 15min a 4°C
2. Eliminar el sobrenedant per decantació i re-suspendre el pèl·let en 10ml de tampó P1

3. Afegir 10ml de tampó P2 i agitar per inversió 4 o 5 vegades
4. Incubació a temperatura ambient durant 5min
5. Afegir 10ml de tampó P3 i agitar per inversió 4 o 5 vegades
6. Incubar en gel durant 20min
7. Centrifugar a $\geq 20.000g$ durant 30min a $4^{\circ}C$
8. Traspasar sobrenedant, amb la precaució de no arrossegar cap residu sòlid al nou tub
9. Centrifugar a $\geq 20.000g$ durant 15min a $4^{\circ}C$
10. Afegir a una columna QIAGEN-tip 500 10ml del tampó d'equilibració QBT, menyspreant l'eluent
11. Afegir a la columna els 30ml de sobrenedant obtinguts de l'última centrifugació, amb la precaució de no arrossegar cap residu sòlid
12. Menysprear l'eluent
13. Afegir 30ml del tampó QC a la columna
14. Menysprear l'eluent
15. Afegir 30ml del tampó QC a la columna
16. Menysprear l'eluent
17. Afegir 15ml del tampó QF i recollir l'eluent en un tub nou
18. Afegir 10,5ml d'isopropanol i agitar per a la seva completa homogeneïtzació
19. Incubar 30min a $-20^{\circ}C$
20. Centrifugar a $\geq 15.000g$ durant 30min a $4^{\circ}C$
21. Eliminar sobrenedant
22. Afegir $400\mu l$ d'etanol 70% i re-suspendre el pèl·let
23. Traspasar els $400\mu l$ a un tub eppendorf
24. Afegir $400\mu l$ més d'etanol 70% al tub i recollir el que queda de pèl·let
25. Traspasar a l'eppendorf
26. Centrifugar a $\geq 15.000g$ durant 10min a $4^{\circ}C$
27. Eliminar el sobrenedant amb compte de no desenganxar el pèl·let
28. Deixar assecar a temperatura ambient per eliminar les restes d'etanol
29. Re-suspendre en uns $200\mu l$ de TE

2.1.10. Amplificació per a seqüenciació

Per comprovar que les amplificacions realitzades no contenen mutacions es va realitzar la seva seqüenciació utilitzant el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems).

Protocol:

1. Afegir en un tub eppendorf:

Mostra de DNA	0,35 μg
Terminator ready reaction mix	2 μl
H ₂ O	fins 10 μl
2. Mesclar amb la pipeta i centrifugar per baixar el contingut al fons del tub
3. Introduir al termociclador aquestes condicions:

96 $^{\circ}C$ -----	5min
25 cicles de:	
96 $^{\circ}$ -----	10seg
50 $^{\circ}C$ -----	5seg
60 $^{\circ}C$ -----	4min
60 $^{\circ}C$ -----	5min
4 $^{\circ}C$ -----	∞
4. En finalitzar la reacció afegir $10\mu l$ més d' H₂O

Les mostres es van portar al departament de genòmica del Parc Científic de Barcelona. Una vegada seqüenciades fem la seva anàlisi amb el programa Chromas i tècniques bàsiques d'alineament (Blast).

2.2. Vectors d'expressió creats

2.2.1. PM2(Gal4)-Math6 i els diferents constructes

Es va amplificar la seqüència de Math6 i els diferents constructes per PCR, a partir del vector d'expressió pBAT12-myc-Math6, utilitzant els encebadors indicats a la taula de l'annex 1. Un cop amplificat es va clonar dins del vector pGEM-T per després clonar-lo dins del vector d'expressió PM2 utilitzant les dianes de restricció Sall (5') i HindIII (3').

2.2.2. PM3(Gal4)-E47

Es va amplificar la seqüència d'E47 per PCR, a partir del vector d'expressió pCMV.TNT-HA-E47, utilitzant els encebadors indicats a la taula de l'annex 1. Un cop amplificat es va clonar dins del vector pGEM-T per després clonar-lo dins del vector d'expressió PM3 utilitzant les dianes de restricció EcoRI (5') i HindIII (3').

2.2.3. PM3(Gal4)-Neurog3

Es va amplificar la seqüència de Neurog3 per PCR, a partir del vector d'expressió pCMV.TNT-FLAG-Neurog3, utilitzant els encebadors indicats a la taula de l'annex 1. Un cop amplificat es va clonar dins del vector pGEM-T per després clonar-lo dins del vector d'expressió PM3 utilitzant les dianes de restricció EcoRI (5') i XbaI (3').

2.2.4. pCMVTnt-Math6 1-232aa o PAC.CMV-Math6 1-232aa

Es va amplificar la seqüència de Math6 1-232aa per PCR, a partir del vector d'expressió PM2-Math6, utilitzant els encebadors indicats a la taula de l'annex 1. Un cop amplificat es va clonar dins del vector pGEM-T per després clonar-lo dins del vector d'expressió pCMV.Tnt o PAC.CMV utilitzant les dianes de restricció Sall (5') i XbaI (3') i Sall (5') i HindIII (3') respectivament.

2.2.5. pCMVTnt-Math6 Δ Basic o PAC.CMV-Math6 Δ Basic

Es van amplificar les dues seqüències de Math6 Δ Basic per PCR, a partir del vector d'expressió PM2-Math6, utilitzant els encebadors indicats a la taula de l'annex 1. Un cop amplificat es va clonar dins del vector pGEM-T per després clonar-lo dins del vector d'expressió pCMV.Tnt o PAC.CMV utilitzant les dianes de restricció Sall (5') i XbaI (3') i Sall (5') i HindIII (3') respectivament.

3. ADENOVIRUS RECOMBINANTS

Els adenovirus són una eina versàtil i molt eficient que permeten tant sobreexpressar com silenciar gens en cèl·lules de mamífers. Tot i tenir gran nombre d'avantatges com una relativa facilitat de producció, elevada eficiència d'infecció o l'elevada concentració a la qual els podem obtenir, presenten com a principal limitació una expressió transitòria dels gens d'interès.

Per treballar amb adenovirus és necessari incrementar les condicions de seguretat i és necessari l'ús de cabines de flux laminar de bioseguretat nivell 2.

- És necessari portar doble guant i bata de màniga llarga amb punys elàstics
- Dins la cabina hi ha d'haver un contenidor amb lleixiu al 25% per a residus líquids; i contenidors rígids per a residus sòlids (que abans hauran d'haver estat desinfectats amb lleixiu)
- Al finalitzar, la superfície de treball de la cabina s'haurà de tractar amb lleixiu, aigua i alcohol per a la seva correcta desinfecció

3.1. Generació dels adenovirus Ad.CMV-Math6 1-232aa i Ad.CMV-Math6 Δ Basic

La generació de l'adenovirus es realitza en la línia cel·lular HEK293 (*human epithelial kidney*, cèl·lules epitelials humanes de ronyó) i amb la introducció de dos plasmidis que contenen la informació necessària.

Protocol (per 1 pouet d'una placa de 6 pous):

1. Sembrar $2-3 \times 10^5$ cèl·lules HEK293 per pouet
2. Al següent dia, amb una confluència ideal del 70% aproximadament, realitzar la transfecció:
 - A. Transfecció amb Superfect (Qiagen)**
 3. Afegir a un tub estèril:

Plasmidi pJM17	2 μ g
Plasmidi PAC.CMV-Math6 1-232aa o Δ basic	1,5 μ g
(Ràtio pJM17: PAC.CMV 1:2 – 1:4)	
Medi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) sense suplementar	100 μ l
Superfect (Qiagen)	8-16 μ l
 4. Pipetejar per homogeneïtzar la mostra
 5. Incubar 10min a temperatura ambient
 6. Afegir 1ml de medi de cultiu suplementat
 7. Pipetejar per homogeneïtzar la mostra
 8. Aspirar el medi de cultiu de la placa
 9. Afegir el contingut del tub a cada pouet
 10. Incubar tota la nit en l'incubador a 37°C. Afegir 2ml de medi suplementat i deixar-lo fins que sigui necessari el seu canvi (anar monitoritzant)
 - B. Observació de clapes**
 11. Passada una setmana, comprovar l'aparició de zones on s'observi lisi cel·lular (clapa)
 12. Les clapes apareixen a partir de la segona setmana de la transfecció, i com a màxim a les 4 setmanes.
 - 12.1. Si apareixen clapes, deixar el medi durant 2-3 dies fins que s'observi una lisi completa de tot el pou. Moment en el que recollirem tot el medi que contindrà l'adenovirus i procedirem a la seva congelació.
 - 12.2. Si no apareixen clapes i el medi s'esgota, és a dir, canvia el pH i comença a groguejar, es posa medi de cultiu nou periòdicament. Si passades 4 setmanes no ha aparegut cap clapa repetir la transfecció provant altres condicions

3.2. Amplificació d'adenovirus recombinants

Protocol:

1. Sembrar cèl·lules HEK293 en flascons de 25, 75 o 175cm²
2. Quan les cèl·lules estan a una confluència aproximada del 80% afegir uns 100, 250 o 500µl d'adenovirus respectivament (aquestes són quantitats orientatives, a major quantitat d'adenovirus, més ràpida serà la seva producció; i a major volum de medi de cultiu, més diluïts tindrem els adenovirus finals)
3. Deixar fins a la completa lisi del flascó, unes 24-48h
4. Recollir el medi de cultiu, pipetejant de manera que arrosseguem les cèl·lules que s'hagin pogut quedar adherides al flascó i es lisin per un mecanisme físic
5. Fem un cicle de congelació descongela del medi amb adenovirus
6. Centrifuguem a 500g durant 5min a 4°C
7. Recollim el sobrenedant menyspreant el pèl·let
8. Aliquotem i congelem, essent aquest format el lisat cru adenoviral de treball

3.3. Aïllament del DNA víric

Per tal de comprovar que els adenovirus generats són correctes, és necessari extreure el DNA viral del lisat cru i comprovar-lo per PCR o seqüenciació.

Protocol:

1. Afegir a un tub:

Lisat cru adenoviral	250-500µl
Solució de lisi.....	250-500µl
2. Incubar 1 hora a 56°C.
3. Afegir un volum de fenol:cloroform:isoamil alcohol (25:24:1, pH 8,0, EDTA 1mM, Sigma) i agitar per homogeneïtzar
4. Centrifugar a ≥10.000g durant 3-5min
5. Transferir la fase aquosa (sobrenedant) a un nou tub
6. Precipitar el DNA afegint 0,1 vol d'acetat sòdic 3M, pH 5,2 i 2 volums d'etanol absolut
7. Incubar a -20°C durant mínim 1h
8. Centrifugar a màxima velocitat durant 20min a 4°C
9. Eliminar el sobrenedant i rentar el pèl·let amb 1ml d'etanol 70%
10. Centrifugar a màxima velocitat durant 5min a 4°C
11. Eliminar el sobrenedant i deixar assecat a temperatura ambient
12. Re-suspendre el pèl·let amb solució TE (volum variable en funció de la mida del pèl·let 100-300µl)
13. Amplificació del DNA per PCR per analitzar en gel o seqüenciar

Solucions utilitzades:

Solució de lisi	
Proteïnasa K a 20mg/ml (Invitrogen)	25µl
Solució EDTA 0,5M, pH 8,0 (Sigma)	80µl
SDS (dodecilsulfat sòdic) (10%) (Serva)	10µl
H ₂ O	fins 1ml

3.4. Titulació d'adenovirus recombinants

Existeixen diferents assajos per conèixer la concentració de partícules víriques obtingudes durant el procés d'amplificació. L'utilitza't en aquesta tesi és el TCID₅₀ (*50% Tissue Culture Infective Dose*) que quantifica la quantitat de virus requerida per lisar el 50% de les cèl·lules hoste (HEK293). S'han de realitzar una bateria de dilucions adenovíriques i observar quina és la màxima dilució capaç de lisar

les cèl·lules. El percentatge de mort cel·lular (cèl·lules infectades) és observat manualment i els resultats obtinguts són emprats per calcular matemàticament el TCID50.

Protocol (realitzat per duplicat per cada virus):

1. Tripsinitzar un flascó de 75cm² de HEK293, comptar les cèl·lules i preparar una dilució de 3*10⁵ cèl·lules/ml en medi de cultiu
2. Sembrar 100µl per pouet (2*10⁴ cèl·lules) en una placa de 96 pous
3. Incubar a 37°C unes 24h
4. Preparar la bateria de dilucions (fig.22) :
 - 4.1. Dilució 10⁻²: Afegir a un tub 495µl de medi de cultiu de HEK293 més 5µl de la solució d'adenovirus que volem titular. Homogeneïtzar pipetejant
 - 4.2. Dilució 10⁻⁴: Afegir a un tub 495µl de medi de cultiu de HEK293 més 5µl de la dilució 10⁻². Homogeneïtzar pipetejant
 - 4.3. Dilució 10⁻⁶: Afegir a un tub 495µl de medi de cultiu de HEK293 més 5µl de la dilució 10⁻⁴. Homogeneïtzar pipetejant
 - 4.4. Dilució 10⁻⁷: Afegir a un tub de 5ml (BectonDickinson) 1,8ml de medi més 200µl de la dilució 10⁻⁶. Homogeneïtzar pipetejant
5. Repetir el pas 4.4 fins la dilució 10⁻¹⁴
6. Afegir a cada fila de la placa de 96 pous 100µl d'una de les dilucions, partint de la dilució 10⁻⁷ i acabant en la dilució 10⁻¹⁴, deixant les columnes 11 i 12 lliures (controls negatius) on afegirem 100µl de medi sense adenovirus
7. Deixar la placa a l'incubador durant 10 dies
8. Observar cada pouet i anotar en aquells pouets on hi ha lisi cel·lular (presència de clapes)

Calcular la concentració d'adenovirus amb la següent fórmula, on C és la concentració obtinguda en PFU/ml (*Plate forming units*, unitats formades de clapes):

$$A_i = \frac{\text{Pouets positius}}{10} \quad ; \quad i = 10^{-1} \dots 10^{-14}$$

$$B = \sum A_i$$

$$C = 10^{[(B-0.2) \times 10]} \text{ PFU/ml}$$

Per a que la lectura es consideri vàlida, cal que cap dels pouets de la dilució màxima (10⁻¹⁴) tingui signes de lisi i que, per contra, tots els pouets de la dilució mínima (10⁻⁷) estiguin lisats. D'altra banda, les columnes 11 i 12 que contenen cèl·lules no tractades no han de mostrar cap signe de lisi. Usualment, les titulacions dels lisats crus que fem en els experiments estan en el rang de 10⁻⁸ a 10⁻⁹ PFU/ml.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	<u>Controls negatius</u>	
10^{-7}												
10^{-8}												
10^{-9}												
10^{-10}												
10^{-11}												
10^{-12}												
10^{-13}												
10^{-14}												

Figura 22. Representació esquemàtica de com distribuir les diferents dilucions en una placa de 96 pouets.

3.5. Infecció amb adenovirus recombinants

A l'hora d'infectar s'ha de tenir en compte la multiplicitat d'infecció (MOI, multiplicity of infection). La MOI es determina de manera molt senzilla, dividint el nombre de partícules víriques que s'afegeixen (ml medi x PFU/ml) pel nombre de cèl·lules (ml medi x cèl·lules/ml). Treballem amb MOI de 40 a 100.

Protocol:

1. Plaquejar el nombre de cèl·lules desitjat
2. Després de 24 hores, preparar la barreja del medi amb el virus
3. Treure el medi de les cèl·lules i afegir el medi amb el virus a les cèl·lules i deixar 2h a 37°C
4. Treure el medi amb el virus i afegir medi nou sense virus

3.5.1. Infecció amb dos adenovirus

3.5.1.1. Sobreexpressió

La infecció per sobreexpressar Math6 en presència d'altres adenovirus es realitza de la mateixa manera que una infecció simple, seguint el protocol detallat anteriorment. En aquest cas sempre i sempre que realitzem una doble infecció, emprarem la mateixa MOI per cadascun dels adenovirus (per exemple 50+50).

3.5.1.2. Silenciament

La infecció emprant els adenovirus específics per silenciar l'expressió de Math6 es fa en un entorn on també expressem Neurog3 (Ad-Neurog3) o un adenovirus control (Ad-βgal). No són infeccions simultànies amb els dos adenovirus a la vegada degut a que per separat millora l'eficiència del silenciament gènic de Math6.

Protocol:

5. Plaquejar el nombre de cèl·lules desitjat
6. Després de 24 hores, preparar la barreja del medi amb el virus shMath6 o shControl
7. Treure el medi de les cèl·lules i afegir el medi amb el virus a les cèl·lules i deixar 4h a 37°C
8. Preparar la barreja del medi amb els virus Neurog3 o βgal
9. Treure el medi amb el virus i afegir el medi amb el virus a les cèl·lules i deixar 2h a 37°C
10. Treure el medi de les cèl·lules i afegir medi sense virus

4. RNA I DETERMINACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

4.1. Extracció de RNA

Per procedir a l'extracció de RNA, tot el material emprat ha d'estar lliure de ribonucleases (RNases). Les pipetes, guants, superfície i materials de treball han de ser tractats per assegurar un ambient lliure de RNases. Per això s'utilitza de forma rutinària RNaseZAP (Sigma).

Un únic mètode d'extracció de RNA ha estat utilitzat, extracció mitjançant columnes de QIAGEN (RNeasy mini o micro kit), ja sigui per cultius cel·lulars, teixits embrionaris i/o adults.

4.1.1. Mètode de purificació per columnes (RNEASY MINI i MICRO KITS)

Aquest mètode de purificació es basa en la capacitat d'unes resines de sílica gel per captar fragments de RNA superiors a 200pb (parells de bases). Aquest mètode s'ha utilitzat per l'extracció de RNA d'illots (micro kit) i pàncrees embrionaris des de e12.5 fins e16.5, i per la majoria d'experiments de cèl·lules en cultiu (mini kit).

Protocol:

1. Homogeneïtzació
 - 1.1. Partir d'un pèl·let d'illots (mínim 100 fins 300) o del primordi pancreàtic de l'edat compresa entre e12.5 fins e16.5 o d'un pèl·let de cèl·lules d'un pou d'una placa de 6 pouets i afegir 350 µl de la solució RLT, on hem afegit β-mercaptoetanol (10µL de β-mercaptoetanol per ml de RLT)
 - 1.2. Homogeneïtzar el teixit amb una xeringa estèril de 30G (En aquest pas es pot conservar a -80°C o seguir amb el protocol)
 - 1.3. Afegir el mateix volum d'etanol 70% i mesclar-ho tot bé amb la pipeta
2. Càrrega a la columna
 - 2.1. Afegir un màxim de 750µl de la mescla a la columna i centrifugar 1min a 10.000rpm
 - 2.2. Descartar líquid que està al tub recol·lector i repetir el pas 2.1 fins esgotar la mostra
 - 2.3. Rentar la columna amb 350µl de la solució RW1, centrifugar 1min a 10.000rpm i descartar el líquid que ha passat a través de la columna
3. Tractament amb DNasa
 - 3.1. Afegir 80µl de la solució de DNasa (70µl de la solució RDD més 10µl de la solució de DNasa) directament sobre la membrana de la columna
 - 3.2. Incubar a temperatura ambient durant 20min
 - 3.3. Descartar el líquid que ha passat a través de la columna
4. Rentats i elució
 - 4.1. Afegir 500µl de la solució RPE, centrifugar 1min a 10.000rpm i descartar el líquid que ha passat a través de la columna
 - 4.2. Repetir el pas anterior
 - 4.3. Centrifugar a 8.000rpm durant 1min
 - 4.4. Canviar el tub eppendorf receptor de l'eluent
 - 4.5. Afegir de 35-40µl d'aigua lliure de RNases directament sobre la membrana sílica gel i incubar 1min a temperatura ambient

4.6. Centrifugar a 10.000rpm durant 1min

4.2. Quantificació del RNA i determinació de la seva integritat

La valoració de la quantitat de RNA es va fer inicialment per espectroscòpia, valorant la seva absorbància a 260nm i utilitzant la formula de Beer-Lambert, on s'estableix la relació lineal entre l'absorbància i la concentració. Amb el temps, el laboratori va adquirir un Nanodrop (Thermo Scientific), espectrofotòmetres de nova generació que amb 1µl de mostra poden valorar la seva absorbància i tenen un rang de treball de 2 a 4000ng/µl. Una forma indirecta d'observar la puresa del RNA és a través de la ràtio de les absorbàncies de la mostra a 260 i 280nm. Ràtios Abs_{260}/Abs_{280} iguals o superiors a 1,8 indiquen una qualitat òptima del RNA.

Quan s'extreu el RNA d'un material biològic és fonamental garantir la seva qualitat i poder assegurar d'aquesta manera, que els resultats obtinguts en els següents experiments siguin vàlids. Quan extraiem RNA total, aquests és ric en RNA ribosomals (rRNA) 18s i 28s. En observar el seu perfil per garantir un bona qualitat, s'han de poder observar dues bandes de major intensitat que corresponen als rRNA.

4.2.1. Determinació de la integritat del RNA per electroforesi en gel d'agarosa desnaturalitzant

Tot el material ha de ser lliure de RNases. És convenient emprar material exclusiu per aquest tipus de gels.

Protocol:

- Preparació d'un gel d'agarosa desnaturalitzant (50ml):
 1. Afegir a un recipient:
 - Aigua lliure de RNases35ml
 - Agarosa (Sigma)0,55g
 2. Escalfar en un microones fins que l'agarosa es fongui
 3. Afegir sota campana quan l'agarosa s'hagi refredat fins aproximadament 50°C:
 - MOPS (tampó d'àcid 3-(N-morfolino)propanosulfònic) 10x (Ambion)..... 5ml
 - Formaldehid al 30% (Sigma)10ml
 4. Deixar polimeritzar amb una pinta per formar els pouets
 5. Introduir el gel en una cubeta amb tampó MOPS 1x
- Preparació de les mostres:
 1. Traspasar entre 3 i 5µg de RNA en un tub
 2. Afegir 15µl de tampó formaldehid de càrrega (Ambion)
 3. Escalfar la mostra 15min a 65°C (desnaturalització) i refredar en gel
 4. Afegir 1µl de bromur d'etidi (Sigma) i carregar les mostres en el gel i sotmetre'l a una càrrega d'uns 50V

Una vegada el gel ha corregut més o menys 5cm es visualitza amb una làmpada UV, on, si la integritat és correcta, s'han d'observar dues bandes més intenses, essent la de 28s (superior) més intensa que la de 18s (inferior) (fig.23).

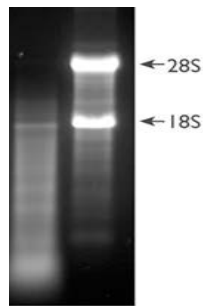


Figura 23. Revelat d'un gel on la primera columna és un RNA totalment degradat i el de la segona té una qualitat molt superior.

4.2.2. Determinació de la seva integritat per Bioanalyzer

Aquest aparell de Agilent es basa en els mateixos principis que l'aparat anterior però de forma automatitzada. Aquest fet presenta uns avantatges considerables davant l'altre mètode: més precisió, rapidesa i requeriment de menys mostra. És una prova imprescindible per garantir la integritat del RNA en processos com els microarrays.

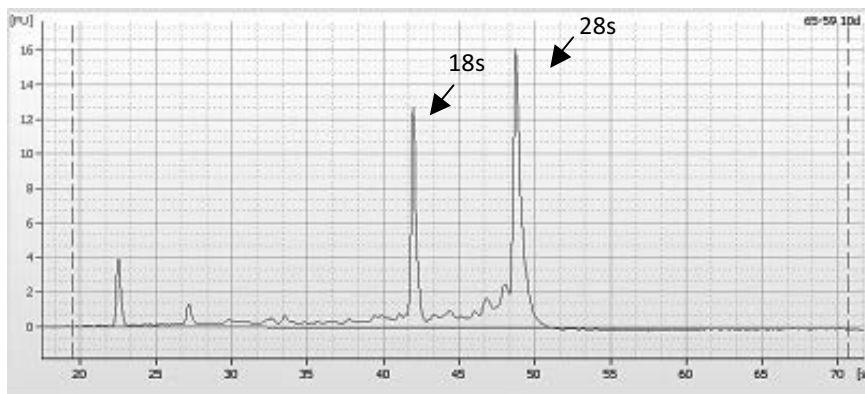


Figura 24. Electroforograma d'una mostra d'illots amb gran integritat.

4.3. Retrotranscripció de RNA a cDNA

Principalment es va emprar la retrotranscriptasa d'Invitrogen SuperScript III.

4.3.1. Protocol SuperScript III

Protocol:

- Afegir a un tub de 0,2 ml:
 - Random primers0,5µg
 - RNA0,5 a 5µg

- Aigua lliure de RNasesfins 10µl
2. Escalfar el tub a 70°C durant 10min
 3. Refredar en gel
 4. Afegir:
 - Tampó de primera cadena (first strand buffer) (5x)4µl
 - DTT (ditiotretitol) 0,1M2µl
 - Mescla de dNTPs a 10mM 1µl
 - RNaseOUT (40U/µl)0,5µl
 - SuperScript III (200U/µl)1µl
 - Aigua lliure de RNases1,5µl
- Usualment es prepara una barreja “master mix” que servirà per totes les mostres. S’afegeix 10ul de master RT mix per tub de RNA+random primers.
5. Incubar en un termociclador a:
 - 25°C durant 5min
 - 42°C durant 15min
 - 50°C durant 60-90min
 - 55°C durant 10min
 - 70°C durant 15min (inactivació)
 - 4°C fins la retirada del tub

4.4. PCR a Temps Real i anàlisi de l’expressió gènica

La tècnica de PCR a temps real o quantitativa ens permet observar com es van amplificant els diferents transcrits cicle per cicle, és a dir, mesurar l’expressió gènica de les mostres que es volen analitzar. Existeixen diverses formes per tal de fer aquest seguiment amb diferents fluoròfors i encebadors, encara que en aquesta tesi hem emprat únicament el fluoròfor SYBRgreen. Aquest s’uneix a doble cadena de DNA, de tal manera que quant més amplificació del transcrit tinguem, major fluorescència observarem.

Quan es passa cert límit de fluorescència (*threshold*), es considera que a partir d’aquell moment el gen en estudi és present, i el cicle en el que això succeeix se’l defineix com Ct (*threshold cycle*). Per establir un punt de tall on considerem que el nostre gen és present en la nostra mostra, es va aplicar l’algoritme que de forma automàtica executa el programa SDS (Sequence Detection System, sistema de detecció de seqüències d’Applied Biosystems), el qual es basa en seleccionar un punt suficientment elevat per diferenciar entre el soroll de fons i un suficientment baix per no arribar al límit de saturació (fase exponencial del senyal) (fig.25).

Per a la quantificació dels resultats es va analitzar l’expressió d’un gen control que s’expressa de forma homogènia en les diferents mostres emprades. Això ens permetrà normalitzar els resultats, que s’expressaran com una ràtio entre el valor del gen que estudiem respecte el valor del gen control (mètode $\Delta\Delta Ct$). Com a gen control rutinari hem emprat el gen Tbp (TATA binding protein) o el gen de la Actb (beta-actina).

Protocol:

- Afegir per pou de placa de 96 pouets per a PCR a temps real (Applied Biosystems):
 - SYBRGreen Master Mix 2x (Applied Biosystems).....5 μ l
 - Mescla d'encebadors a 10 μ M0,25 μ l
 - cDNA4 μ l
 - H₂O destil·lada0,75 μ l
- Centrifugar breument per baixar el contingut
- Introduir al termociclador 7900HT (Applied Biosystems) amb les condicions predeterminades:
 - 50°C-----2min
 - 5°C-----10min
 - 40 cicles de:
 - 95°C-----15s (fase de desnaturalització)
 - 60°C-----1min (fase d'anellament i extensió)
 - 95°C-----15s
 - Increment de 60°C a 95°C a una velocitat d'uns 1,92°C/min (fase de corba de dissociació)

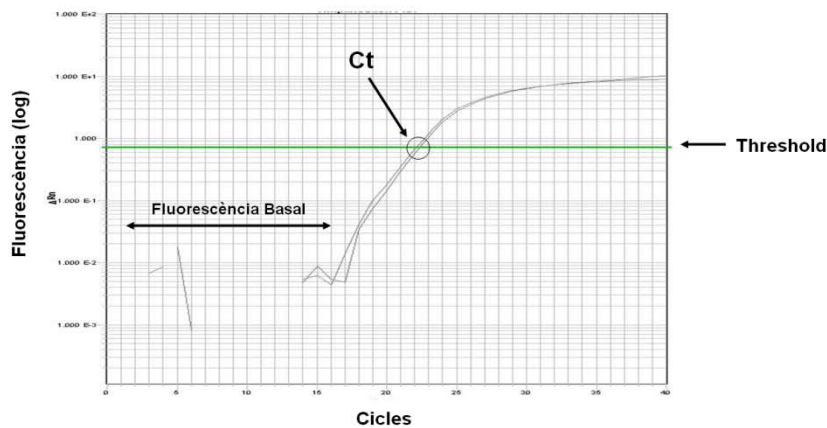


Figura 25. Gràfica d'amplificació d'una PCR a temps real. L'eix vertical representa la quantitat de fluorescència normalitzada, i l'eix horitzontal el nombre de cicles. La fluorescència basal es refereix als cicles inicials en els que no hi ha canvis detectables en la quantitat de fluorescència. El *threshold* és el llindar on es produeix un canvi significatiu de la fluorescència i el tall entre aquest llindar i la corba d'amplificació determina el Ct o el cicle llindar, el qual s'utilitza per quantificar. El càlcul de la Ct sempre es realitza en la fase exponencial de la corba.

Aquesta tècnica mesura la fluorescència total de les cadenes dobles de DNA unides a SYBRgreen. Aquest fet provoca que, si apareixen diversos transcrits durant l'amplificació, la fluorescència observada serà la total de tots els transcrits. Afegint la fase de corba de dissociació podem veure l'especificitat dels encebadors, i en el cas que aparegui més d'un pic de fluorescència (és a dir, més d'un transcrit) la millor opció serà dissenyar uns nous encebadors més específics per al gen d'interès.

4.4.1. Validació encebadors

El disseny i validació dels encebadors d'un gen específic és de summa importància degut al mètode de quantificació que utilitzem (mètode $\Delta\Delta$ Ct). Uns resultats reproduïbles requereixen que l'eficiència del nostre gen control i del nostre gen problema siguin el més similars possible. Les eficiències

acceptables per als encebadors emprats són d'un mínim del 85%, i aquesta eficiència es calcula a partir de la pendent d'una corba estàndard realitzada per testar aquest parell d'encebadors (Eficiència = $(10^{-1/\text{pendent}} - 1)$).

5. PROTEÏNES

5.1. Extracció de proteïnes

5.1.1. Extracció de proteïnes totals de cultius cel·lulars

Protocol:

1. Aspirar el medi de cultiu
2. Rentar amb DPBS i posar la placa en gel per preservar la integritat de les proteïnes
3. Aspirar el DPBS i afegir una quantitat suficient de tampó de lisi per a cobrir el pou (75 µl per pou de placa de 6 pouets)
4. Recollir el lisat cel·lular amb l'ajuda d'un raspador (scraper) i traspasar-lo a un eppendorf. Mantenir el lisat en gel durant aproximadament 20min.
5. Per ajudar a lisar bé les cèl·lules, podem utilitzar una xeringa d'insulina (0,5ml) que conté agulla de diàmetre 30G
6. Centrifugar la mostra a màximes revolucions 15-20min a 4°C per baixar totes les restes cel·lulars
7. Recollir el sobrenedant i passar-lo a un tub net

Solucions utilitzades:

Tampó TLDB (Triple Lysis Detergent Buffer), per a preparar 10ml de tampó:

Tris pH 8,0	50mM
NaCl	150mM
SDS 10%	100µl
NP-40 (IGEPAL).....	100µl
Deoxicolat sòdic.....	50mg
H ₂ O.....	fins a 10ml

Guardar l'estoc a -20°C. En el moment de la seva utilització, per a preparar per exemple 1ml de tampó barregem:

Tampó TLDB	900µl
Còctel inhibidor de proteases 10X (Sigma)	100µl

5.1.2. Extracció i separació de proteïnes citoplasmàtiques i nuclears de cultius cel·lulars

Protocol:

1. Aspirar el medi de cultiu
2. Rentar amb DPBS i posar la placa en gel per preservar la integritat de les proteïnes
3. Aspirar el DPBS i afegir una quantitat suficient de tampó de lisi citoplasmàtic per cobrir la placa (500 µl per una placa de 10cm)
4. Lisar les cèl·lules amb l'ajuda d'un raspador (scraper) i traspasar el lisat cel·lular a un eppendorf. Mantenir el lisat en gel durant 10 minuts
5. Centrifugar la mostra a 3.000 rpm durant 5min a 4°C
6. Recollir el sobrenedant i passar-lo a un tub net (fracció citoplasmàtica)
7. Rentar el pèl·let dues vegades amb DPBS
8. Segon cicle de lisi, afegim 200 µl de tampó de lisi nuclear i deixem en gel durant 30 min
9. Centrifugar la mostra a màxima velocitat durant 20 min a 4°C
10. Recollir el sobrenedant i passar-lo a un tub net (fracció nuclear)

Solucions utilitzades:

Tampó lisi citoplasmàtica, per a preparar 50ml de tampó:

Hepes pH 8,0.....	10mM
MgCl ₂	1,5mM
KCl	10mM
Sucrosa.....	300mM

NP-40 (IGEPAL).....	50µl
H ₂ O.....	fins a 50ml

Guardar l'estoc a 4°C. En el moment de la seva utilització, per a preparar per exemple 1ml de tampó barregem:

Tampó lisi citoplasmàtic.....	875µl
DTT 1M.....	25µl
Còctel inhibidor de proteases 10X (Sigma)	100µl

Tampó lisi nuclear, per a preparar 25ml de tampó:

Hepes pH 7,9.....	50mM
KCl	250mM
EDTA.....	0,1mM
EGTA.....	0,1mM
NP-40 (IGEPAL).....	25µl
Glicerol 25%	100µl
H ₂ O.....	fins a 25ml

Guardar l'estoc a 4°C. En el moment de la seva utilització, per a preparar per exemple 1ml de tampó barregem:

Tampó lisi nuclear	875µl
DTT 1M.....	25µl
Còctel inhibidor de proteases 10X (Sigma)	100µl

5.2. Quantificació de proteïnes

Utilitzem el mètode de l'assaig de proteïnes de Bio-Rad DC que es basa en una modificació del mètode de valoració de proteïnes Lowry.

Protocol:

1. Preparem una corba estàndard de BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma) a partir d'una dilució estoc a 2mg/ml. Preparem les diferents concentracions diluint en H₂O: 1,5mg/ml; 1,0mg/ml; 0,75mg/ml; 0,5mg/ml; 0,25mg/ml; i 0mg/ml
2. Ho afegim per aquest ordre i en duplicat 5µl de cada mostra en una placa transparent de 96 pous
3. Afegim 5µl de la mostra a quantificar, també per duplicat
4. Afegim 25µl de la solució A' (barreja de les solucions A i S, per a 1ml posem 980µl de la solució A i 20µl de la solució S, tal i com indica el protocol), tant a la corba com a les mostres
5. Afegim 200µl de la solució B, tant a la corba com a les mostres
6. Barregem i deixem incubar uns 15 minuts en la foscor a temperatura ambient

5.3. Detecció de proteïnes

5.3.1 Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE)

Les proteïnes es separen en funció del seu pes molecular mitjançant electroforesi amb SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis). Utilitzem l'aparell MiniProtean Kit de Bio-Rad.

Protocol:

1. Netejar els vidres amb aigua i etanol, els assequem bé
2. Fer el muntatge dels vidres sobre els suports, i mirar que estiguin ben segellats i no perdin líquid
3. Afegir la fase separadora (resolving solution) fins el volum que després ens permeti afegir les pintes
4. Afegir butanol (Carlo Erba) saturat en aigua (1:1) per eliminar les bombolles que hagin pogut quedar a la part superior del gel i alinear-la
5. Deixar polimeritzar
6. Eliminar el butanol per decantació, rentar amb aigua i assecar les restes amb un paper 3MM (Whatman®)
7. Afegir la fase concentradora (stacking solution) i col·locar la pinta que forma els pous abans que polimeritzi el gel
8. Deixar polimeritzar
9. Col·locar els vidres amb el gel en el suport corresponent per posar-ho dins la cubeta de la MiniProtean

10. Afegir el tampó d'electroforesi 1X entremig dels vidres per mirar que no perdi líquid, i un cop s'observa que està tot segellat reomplir la cubeta amb més tampó d'electroforesi 1X
11. Treure les pintes amb cura i rentar els pous
12. Preparar les mostres:
 - 12.1. Preparar el volum corresponent a la quantitat de mostra desitjada, generalment 50µg de proteïna
 - 12.2. Afegir-hi el tampó de càrrega Laemmli 2X en una proporció 1:1
 - 12.3. Desnaturalitzar les mostres a 95°C durant 5min en un bany sec
13. Carregar el marcador de pes molecular (Full-range Rainbow molecular weight marker, GE Healthcare) i les mostres desnaturalitzades
14. Tancar la cubeta MiniProtean i córrer el gel a un voltatge constant (entre 100 i 120V) durant 1-2 hores, fins que el front de les mostres s'escapi del gel

Solucions utilitzades:

Fase separadora (resolving solution): per a un gel petit de 10ml del 12%:

H ₂ O	3,3ml
Acilamida/Bis-acilamida al 29/1% (Bio-Rad)	4ml
Tris 1.5M pH 8.8	2,52ml
SDS (sodium dodecyl sulfate) 10%	0,1ml
Persulfat d'amoni 10% (APS) (Sigma)	0,08ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina)	0,0032ml

Fase concentradora (stacking solution): preparem un volum final de 5ml

H ₂ O	3,43ml
Acilamida/Bis-acilamida al 29/1% (Bio-Rad)	0,83ml
Tris 1.0M pH 6.8	0,63ml
SDS (sodium dodecyl sulfate) 10%	0,05ml
Persulfat d'amoni 10% (APS) (Sigma)	0,05ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina)	0,005ml

Tampó d'electroforesi 10X (running buffer)

Tris (hidroximetil) aminometà	30g (250mM)
Glicina	144g (1,92M)
H ₂ O	fins a 1L

Guardar l'estoc a temperatura ambient. En el moment de la seva utilització, per a preparar per exemple 1L de tampó d'electroforesi 1X barregem:

Tampó d'electroforesi 10X	100ml
SDS 10%	10ml
H ₂ O	fins a 1L

Tampó de càrrega (Laemmli 2X)

Tris (hidroximetil) aminometà 1M pH 6,8	1ml
Glicerol	2ml
SDS 10%	4ml
H ₂ O	2ml
Blau de bromofenol	unes gotes

Guardar l'estoc a -20°C. En el moment de la seva utilització, afegim 100ul de 1M DTT (Dithiothreitol) per cada 400ul de tampó de càrrega 2X.

5.3.2 Transferència humida de proteïnes

Pas que permet traspasar les proteïnes del gel a una membrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride) (Perkin Elmer, Boston, EUA).

Protocol:

1. Activar una membrana de PVDF submergint-la en metanol (Panreac) durant 30 segons
2. Rentar la membrana en aigua i deixar-la submergida en tampó de transferència
3. Muntar la transferència amb esponges, paper de 3MM (Wathman®), la membrana de PVDF i el gel que conté les proteïnes, tal i com indica la figura 23. Sobretot és important evitar la formació de bombolles entre la membrana i el gel, i intentar mantenir sempre la membrana humida
4. Posar el muntatge en el casset de transferència TransBlot de Bio-Rad
5. Posar els cassets correctament dins de les cubetes de mini TransBlot amb tampó de transferència

6. Col·locar una petaca de gel dins de la cubeta per mantenir la temperatura baixa i col·locar la cubeta en gel o en la càmera freda a 4°C
7. Aplicar un voltatge suficient (normalment al voltant d'uns 100V) per permetre el pas d'un amperatge de 250mA a 350mA en el termini de 1h30min a 2h
8. Transcorregut el temps necessari, desfer el muntatge i submergir la membrana en TBS-T, evitant que s'assequi la membrana. Si això passa, tornar a activar la membrana utilitzant metanol abans de seguir

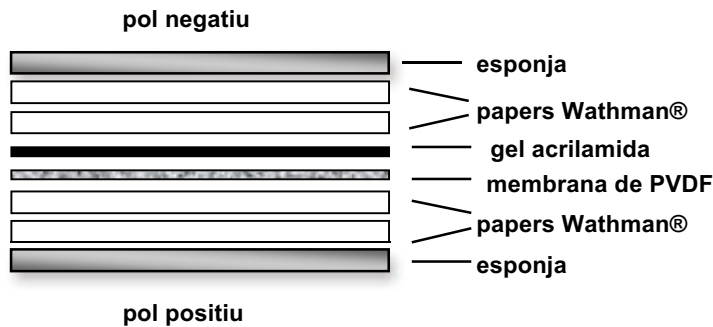


Figura 26. Esquema de muntatge d'un casset de transferència

Solucions utilitzades:

Tampó de transferència

Tampó d'electroforesi 10X.....	100ml
Metanol (MetOH) (Panreac)	200ml
H ₂ O	fins a 1L

TBS 20X (Tris Buffered Saline)

Tris (hidroximetil) aminometà	48g (400mM)
NaCl	175,4g (3M)
H ₂ O	fins a 800ml

Ajustar el pH a 7,4 amb HCl 10N i enrasar fins a 1L d'H₂O

TBS-T (Tris Buffered Saline- Tween20)

TBS20X	50ml
Tween-20 (Sigma)	1ml
H ₂ O	fins a 1L

5.3.3 Bloqueig de la membrana de PVDF

Bloquegem la membrana per evitar les unions inespecífiques de l'anticòs. Hi ha diferents solucions de bloqueig, però habitualment s'utilitza la llet en pols descremada (NFDM, non-fat dried milk) o BSA (Bovine Serum Albumin).

Protocol:

1. Un cop tenim la membrana en TBS-T després de la transferència, submergim la membrana en la solució de bloqueig, que en el nostre cas majoritàriament es tracta del 5% de llet en pols descremada en TBS-T
2. Incubar en solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació
3. Rentar la membrana submergint-la en TBS-T durant 3-5min a temperatura ambient i en agitació
4. Descartar el TBS-T i repetir el procés fins a 2 vegades més

5.3.4 Immunodetecció de proteïnes

Un cop hem bloquejat la membrana, hem d'incubar-la amb un anticòs que ens detectarà la proteïna en la qual estem interessats, i seguidament afegim un segon anticòs que ens detectarà el primer i

que va unit a la peroxidasa de rave picant (HRP, *Horseradish peroxidase*), que ens permetrà la seva detecció gràcies al reactiu ECL (*enhanced chemiluminescence*), que en presència de la peroxidasa emet llum que detectarem utilitzant un film fotogràfic o gràcies a l'aparell ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

Protocol:

1. Després del bloqueig i rentat de la membrana, l'incubem amb l'anticòs primari que està diluït en 5% NFDM en TBS-T o 5% BSA en TBS-T en una dilució adequada (segons el fabricant). La incubació serà a 4°C i en agitació durant tota la nit
2. Rentar la membrana submergint-la en TBS-T durant 10-15min a temperatura ambient i en agitació
3. Descartar el TBS-T i repetim el segon pas dues vegades més
4. Incubar la membrana amb l'anticòs secundari amb una dilució adequada en 5% NFDM en TBS-T, durant 1h a temperatura ambient i en agitació
5. Rentar la membrana submergint-la en TBS-T durant 10-15min a temperatura ambient i en agitació
6. Incubar la membrana amb ECL (Pierce) durant 1min a temperatura ambient
7. En el cas de revelar el senyal mitjançant un film fotogràfic (Fujifilm), col·loquem la membrana dins d'un casset juntament amb un film fotogràfic durant el temps necessari per a veure el senyal adequat i revelar el film amb una reveladora (Fujifilm)
8. En el cas d'utilitzar l'aparell ImageQuant LAS4000, col·locar la membrana sobre la safata de l'aparell coberta per un film transparent per evitar que s'assequi, i mitjançant el software ImageQuant LAS4000 ajustar els paràmetres d'exposició adequats per obtenir el senyal

5.3.5 Eliminació dels anticossos (STRIPPING)

Utilitzant una mateixa membrana podem detectar diferents proteïnes, però per això hem d'eliminar els anticossos que hem afegit anteriorment.

Protocol:

1. Incubar la membrana amb la solució de *stripping* durant 30min a 50°C en un bany amb agitació. És important mantenir-ho tapat per evitar les olors que desprèn el β -mercaptoetanol
2. Rentar la membrana submergint-la en TBS-T durant 5min a temperatura ambient i en agitació
3. Repetir el segon pas fins que la membrana no faci olor de β -mercaptoetanol

Solucions utilitzades

Solució de stripping

Tris (hidroximetil) aminometà 0,5M pH 6,8.....	62,5ml
SDS 10%.....	100ml
β -mercaptoetanol (Sigma).....	3,5ml
H ₂ O.....	fins a 0,5L

5.3.6 Immunoprecipitació (IP)

Els protocols d'immunoprecipitació es fonamenten en la formació de complexos antígen-anticòs específics i en la capacitat de fer precipitar aquests complexos. En aquesta tesi hem emprat aquest tècnica per determinar la formació d' heterodímers entres factors bHLH. En primer lloc hem generat proteïnes recombinants (Flag-Neurog3, myc-Math6 i HA-E47) *in vitro* utilitzant el kit TNT®Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega). D'aquesta forma generem de 2 a 6 vegades més proteïna en un temps reduït, abans de procedir a fer la immunoprecipitació.

Protocol

1. Generació proteïnes recombinants:

- 1.1. Posem els vectors d'expressió que codifiquen per les nostres proteïnes d'interès amb els reactius del kit anteriorment mencionat i seguim les instruccions de la casa comercial deixant-ho tot 2h a 30°C (volum final 50µl)
2. Formació complexos proteics:
 - 2.1. Barrejar: 10µl de les proteïnes que volem veure si formen complexos (E47 amb Math6 o Neurog3)
1000µl tampó CoIP 1x
 - 2.2. Incubar en rotació durant 2-3h a 4°C
3. Formació complex antígen-anticòs:
 - 3.1. Barrejar: 5µl d'extracte proteic (500µl de la solució prèviament preparada)
2-5µg d'anticòs contra la nostra proteïna d'interès (myc, FLAG, HA o una IgG control)
 - 3.2. Incubar tota la nit a 4°C (aproximadament 16h)
4. Afegir 30µl de proteïna G Dynabeads (Invitrogen) prèviament rentat amb PBS 1x
5. Incubar en rotació durant 25min a temperatura ambient
6. Emprar un sistema de magneto per agrupar les Dynabeads i poder eliminar el sobrenedant
7. Fer 2 rentats amb tampó CoIP 1x i un rentat final amb PBS 1x
8. Re-suspendre el pèl·let amb 20µl de tampó de càrrega d'electroforesi (SDS-PAGE) 2x i incubar 10min a 90°C
9. Recollir el sobrenedant evitant agafar Dynabeads. Tenim la solució preparada per ser carregada en un gel d'acrilamida per separar les mostres electroforèticament i continuar com en l'apartat 5.3

Solucions utilitzades:

Tampó de coimmunoprecipitació 1x (CoIP 1x)

- NaCl 100mM
- Tris pH 7,5 20mM
- EDTA 1mM
- NP-40 (IGEPAL) 1% (vol/vol)
- NaF 5mM
- Còctel inhibidor de proteases 1x

5.3.7. Immunohistoquímica o tinció histològica

Per detectar la presència de les hormones pancreàtiques, de Math6 i de diferents marcadors de desenvolupament pancreàtic vam utilitzar tècniques de detecció per immunohistoquímica. Per estudiar morfologia dels teixits hem emprat tincions histològiques.

5.3.7.1. Fixació dels teixits amb PFA

Per conservar els teixits es fixen amb paraformaldehid (PFA, paraformaldehyde) i es fa la seva inclusió en parafina o OCT (Sakura tissue-tek). Un cop els teixits estan conservats en parafina o OCT, es poden seccionar en talls molt fins que permeten realitzar diferents tècniques d'immunohistoquímica.

Protocol Parafina:

1. Extreure el pàncrees (de e15.5 endavant) o l'aparell digestiu (pàncrees+estomac+intestí e14.5) o embrió sencer (e12.5-e13.5) amb certa rapidesa i submergir-lo en solució de rentat DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma) i mantenir en gel fins que s'hagin extret tots els teixits. Es manté cada mostra en un pouet separar d'una placa de 12 pouets
2. Submergir els teixits en solució de paraformaldehid al 4% en DPBS (provinent d'una solució estoc al 16% PFA, Sigma) i deixar un mínim de 4h a 4°C en agitació perquè la solució penetri bé al teixit
3. Treure el PFA 4% i rentar el teixit amb DPBS durant 5min
4. Treure el DPBS i afegir-ne de nou i rentar durant 5min
5. Repetir el quart pas una vegada més, treure el DPBS i afegir-ne de nou per rentar durant 20-30min en agitació i a 4°C
6. Preparar una bateria d'etanols a partir d'etanol absolut (Panreac), passant per etanol 50%, etanol 70% i etanol 95%
7. Eliminar el DPBS, afegir etanol al 50% i incubar 30min a temperatura ambient
8. Eliminar l'etanol al 50%, afegir-ne de nou i incubar 30min a temperatura ambient
9. Eliminar l'etanol al 50%, afegir etanol al 70% i incubar 30min a temperatura ambient
10. Eliminar l'etanol al 70%, afegir-ne de nou i incubar 30min a temperatura ambient. Aquí podem parar la deshidratació del teixit deixant-lo a 4°C o podem seguir endavant amb el pas següent

11. Eliminar l'etanol al 70%, afegir etanol al 95% i incubar 30min a temperatura ambient
12. Eliminar l'etanol al 95%, afegir-ne de nou i incubar 30min a temperatura ambient
13. Eliminar l'etanol al 95%, afegir etanol al 100% i incubar 30min a temperatura ambient
14. Eliminar l'etanol al 100%, afegir-ne de nou i incubar 30min a temperatura ambient
15. Eliminar l'etanol al 100%, afegir xilol (Panreac) i incubar 1h a temperatura ambient
16. Eliminar el xilol, afegir-ne de nou i incubar 1h a temperatura ambient
17. Eliminar el xilol, submergir el teixit en parafina (Paraffin Diawax 56-58°C, DiaPath) líquida a 50°C i incubar 1h a 50°C
18. Eliminar la parafina, submergir el teixit en parafina nova líquida a 50°C i incubar 1h a 50°C
19. Muntar els blocs de parafina utilitzant motlles metàl·lics i cassets d'inclusió amb l'estació de parafina (Leica)
20. Deixar refredar la mostra per a que solidifiqui la parafina

Protocol OCT:

1. Pas del 1 al 5 igual que amb l'inclusió en parafina
2. Eliminar el DPBS i submergir la mostra en un tub eppendorf amb sucrosa 30%. Deixar-ho tota la nit a 4°C o fins que la mostra hagi deixi de surar i es dipositi al fons del tub
3. Rentem el teixit amb OCT
4. Muntem els blocs d'OCT emprant uns motlles especials per realitzar criotalls
5. Congelem amb l'ajuda de neu carbònica i una vegada solidificat l'OCT conservem els blocs fins la seva utilització a -80°C

5.3.7.2. Muntatge dels talls en portaobjectes

Protocol parafina:

1. Realitzar talls del teixit amb un gruix de 3µm utilitzant un micròtom (Leica RM 2135)
2. Posar els talls en un bany d'aigua calenta a 40°C (Leica HistoBath HI1210)
3. Col·locar de 3 a 4 talls en un porta tractat amb poli-L-lisina
4. Deixar assecar les mostres en una estufa a 37°C durant unes hores o a temperatura ambient tota la nit

Protocol OCT:

1. Realitzar talls del teixit amb un gruix de 10-20µm utilitzant un criostat (Leica CM 1950)
2. Col·locar de 3 a 4 talls en un porta tractat especialment per criotalls
3. No deixar escalfar les mostres, guardar a -80°C fins la seva utilització

5.3.7.3. Muntatge dels talls de parafina en portaobjectes per als estudis de morfometria de pàncrees

Protocol (fig.27):

1. Realitzar talls del teixit amb un gruix de 3µm utilitzant un micròtom (Leica RM 2135). Els talls es realitzaran en tires seguides
2. Posar els talls en un bany d'aigua calenta a 40°C (Leica HistoBath HI1210) i tallar conjunts de tires amb tres talls cada un
3. Col·locar de manera ordenada 3 talls seguits en cada porta tractat amb poli-L-lisina formant una primera columna de talls
4. Els 3 talls següents es col·loquen en un segon porta i així fins a 6 portes (en el cas d'aparell digestiu a e18.5) i 4 portes (en el cas d'aparell digestiu e15.5)
5. Un cop tenim la primera columna de talls procedim a generar una segona columna i així fins a 5 columnes en cada porta
6. Quan s'acaba amb el primer conjunt de 5 portes (en el cas de pàncrees a P1) o 4 portes (en el cas de pàncrees a e15.5) repetim els passos del 3 al 5 fins que s'esgoti el teixit (veure esquema de la figura 24)
7. Deixar assecar les mostres en una estufa a 37°C durant unes hores o a temperatura ambient tota la nit

5.3.7.4. Immunofluorescència

5.3.7.4.1. Desparafinització i rehidratació de la mostra:

S'ha de realitzar en el cas de les mostres que provenen de blocs de parafina. En el cas de les mostres submergides en OCT per realitzar criotalls passem directament a l'apartat 5.3.7.4.2.o .3 des de les mostres submergides en DPBS.

Protocol:

1. Submergir les mostres en xilol 5min
2. Submergir les mostres en una solució de xilol nova 5min
3. Submergir les mostres en etanol 100% 5min
4. Submergir les mostres en etanol 96% 5min
5. Submergir les mostres en etanol 70% 5min
6. Submergir les mostres en etanol 50% 5min
7. Submergir les mostres en H₂O 5min
8. Submergir les mostres en PBS fins el proper pas

5.3.7.4.2. Exposició antigènica (antigen retrieval):

Protocol:

1. Aquest pas és opcional, depenent del tipus d'anticòs que utilitzem l'haurem de fer o no. En el cas de les hormones pancreàtiques ens el saltarem. En la resta de marcadors utilitzats en aquesta tesi, haurem de fer-lo
2. Escalfar aigua en una olla a pressió utilitzant una placa calenta a 120°C. Col·locar dins l'olla una cubeta resistent a l'escalfor, on després hi submergirem les nostres mostres, i l'emplenem amb solució citrat. Tancar correctament l'olla i esperar que arribi al punt d'ebullició
3. Quan comenci a bullir l'aigua, obrir amb compte l'olla, submergir les mostres en la solució de citrat i tornar a tancar correctament l'olla
4. Deixar escalfar 10min a 120°C amb l'aigua bullent
5. Passats els 10min, treure l'olla de la placa calenta i deixar refredar. Obrir l'olla i deixar temperar les mostres durant aproximadament 30min
6. Submergir les mostres en PBS 1X (Phosphate Buffered Saline, Roche) durant 5min
7. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.4.3. Permeabilització:

Protocol:

1. Submergir les mostres en solució de permeabilització Tritó X-100 al 0,5% en PBS, i deixar 20min a temperatura ambient
2. Submergir les mostres en PBS 1X durant 5min
3. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.4.4. Bloqueig de les unions inespecífiques:

Protocol:

1. Assecar els portes amb les mostres i treure l'excés de PBS, evitant que s'assequin del tot les mostres
2. Encerclar la mostra amb una solució hidròfoba (Pap Pen)
3. Afegir a les mostres solució de bloqueig (5% sèrum de cabra o 3% sèrum de burro en PBS) i deixar 1h a temperatura ambient en una càmera humida
4. Submergir les mostres en PBS 1X durant 5min
5. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.4.5. Incubació amb l'anticòs primari

Protocol:

1. Assecar els portes amb les mostres i treure l'excés de PBS, evitant que s'assequin del tot les mostres
2. Preparar els anticòs primaris (veure taula annex) diluint-los en solució de bloqueig o en solució diluent d'anticòs (DAKO antibody diluent solution) i afegir a les mostres
3. Deixar tota la nit a 4°C en una càmera humida
4. Eliminar la dilució de l'anticòs primari i submergir la mostra en PBS 1X durant 5min
5. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min
6. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.4.6. Incubació amb l'anticòs secundariProtocol:

1. Assecar els portes amb les mostres i treure l'excés de PBS, evitant que s'assequin del tot les mostres
2. Preparar els anticossos secundaris (veure taula annex) diluint-los en solució de bloqueig o en solució diluent d'anticòs (DAKO antibody diluent solution) i afegir a les mostres
3. Deixar 1h a temperatura ambient en una càmera humida
4. Eliminar la dilució de l'anticòs secundari i submergir la mostra en PBS 1X durant 5 min
5. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min
6. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.4.7. MuntatgeProtocol:

1. Assecar els portes amb les mostres i treure l'excés de PBS, evitant que s'assequin del tot les mostres
2. Afegir a les mostres una gota de solució de Mowiol
3. Col·locar un cobreobjectes sobre la mostra
4. Pressionar suaument amb un paper assecant per eliminar l'excés de solució de muntatge i treure les bombolles que puguin quedar entre el portaobjectes i el cobreobjectes
5. Segellar amb pintura unglés

Solucions utilitzades:Solució de citrat trisòdic 10nM, pH 6,0

Citrat trisòdic (Fluka).....	1,47g
H ₂ O	500ml

PBS-Tritó X-100 0.5%

Tritó X-100 (Sigma-Aldrich)	0,5ml
H ₂ O	99,5ml

Mowiol

1. Afegir en un vas de precipitats
 - Mowiol 4-88 (Calbiochem)7,2g
 - Glicerol (Carlo Erba).....14,3ml
2. Barrejar amb un agitador magnètic durant 1 h a temperatura ambient
3. Afegir 18ml d'H₂O
4. Barrejar amb un agitador magnètic durant 2 h a temperatura ambient
5. Afegir 36ml de 0,2M Tris(hidroximetil)aminometà pH 8,5
6. Barrejar amb un agitador magnètic durant 2h a 50°C
7. Centrifugar a 5000g durant 15min
8. Aliquotar i congelar a -20°C

Portaobjectes tractats amb poli-L-lisina

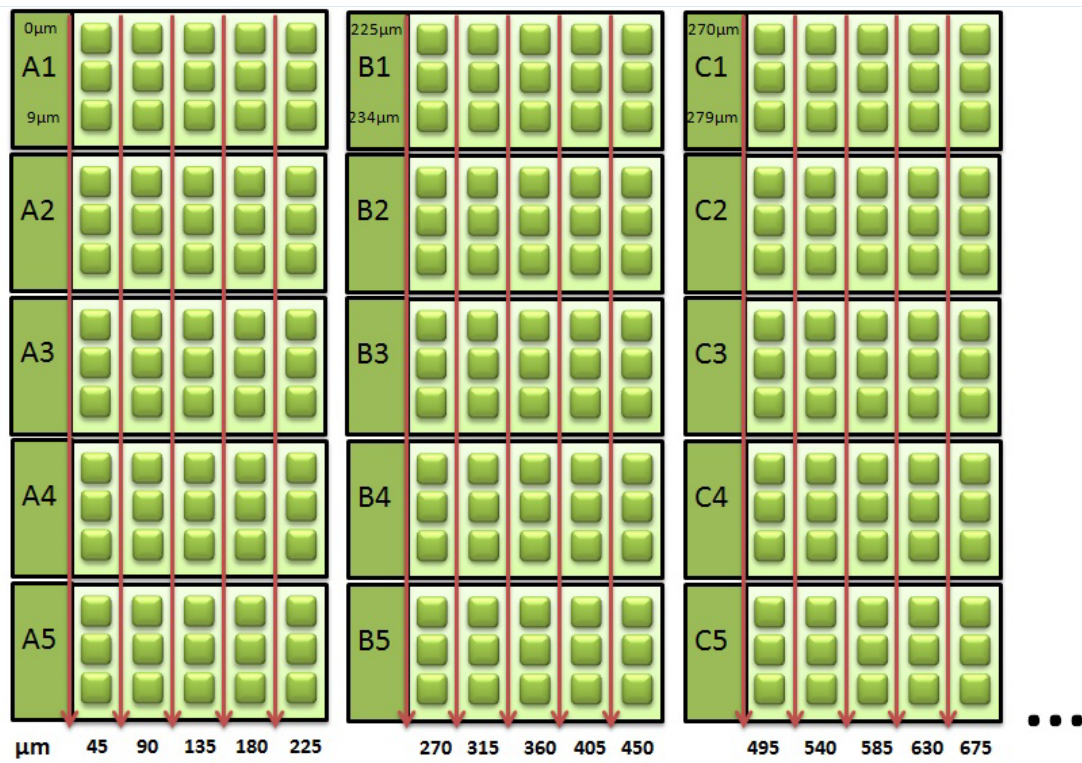
Preparar poli-L-lisina al 0,01%:

Poli-L-lisina al 0,1% (Sigma).....	30ml
H ₂ O.....	270ml

Protocol:

1. Submergir els portaobjectes de vidre nets en una cubeta amb la solució de poli-L-lisina 0,01%, deixar 5min a temperatura ambient
2. Treure els portaobjectes de la cubeta i deixar-los assecar a temperatura ambient tota la nit

A



B

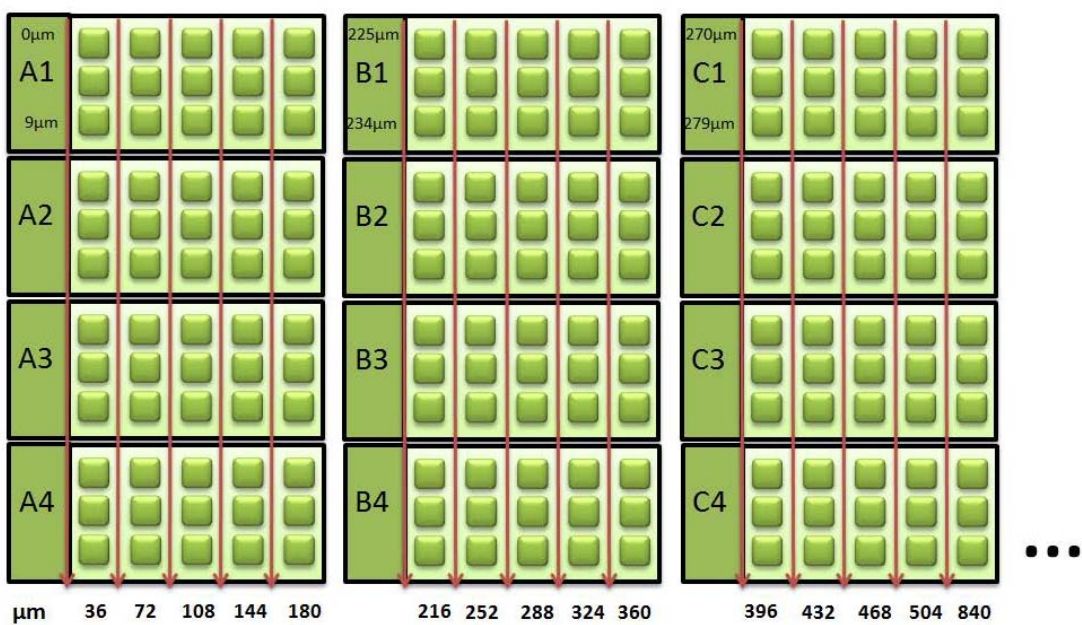


Figura 27. Esquema de muntatge de les morfometries. A) P1 B) e15.5.

5.3.7.5. Tinció Hematoxilina/eosina

Aquesta tinció s'ha emprat per veure la histologia i morfologia del teixit pancreàtic. La tinció amb hematoxilina tenyeix estructures àcides en tons blaus i púrpures com per exemple els nuclis cel·lulars, i la tinció amb eosina tenyeix les estructures bàsiques en tons rosa com per exemple el citoplasma.

5.3.7.5.1. Desparafinització i rehidratació de la mostra:

Protocol:

1. Submergir les mostres en xilol 1min
2. Submergir les mostres en una solució de xilol nova 1min
3. Submergir les mostres en etanol 100% 1min
4. Submergir les mostres en etanol 96% 1min
5. Submergir les mostres en etanol 70% 1min
6. Submergir les mostres en etanol 50% 1min
7. Submergir les mostres en H₂O 1min

5.3.7.5.2. Tinció hematoxilina/eosina:

Protocol:

1. Submergir les mostres en la solució d'hematoxilina durant 15min
2. Esbandir en aigua tèbia (corrent) 5min
3. Submergir en H₂O 1min
4. Submergir en etanol 96% 30s
5. Submergir en la solució d'eosina 1min
6. Submergir en H₂O 1min (fer varis rentats fins treure excés de colorant)

5.3.7.5.3. Deshidratar i muntatge:

Protocol:

1. Submergir les mostres en H₂O 1min
2. Submergir les mostres en etanol 50% 1min
3. Submergir les mostres en etanol 70% 1min
4. Submergir les mostres en etanol 96% 1min
5. Submergir les mostres en etanol 100% 1min
6. Submergir les mostres en xilol 1min
7. Submergir les mostres en una solució de xilol nova 1min
8. Afegir unes gotes de Pertex (CellPath) i posar el cobre

5.3.7.6. Immunocitoquímica

5.3.7.6.1. Preparació de les cèl·lules

Protocol:

1. Desgreixar vidres de rellotge amb etanol i deixar assecar. Seguidament esterilitzar-los sota campana amb l'ajut dels llums ultraviolats (UV)
2. Col·locar el número de vidres necessari (un vidre per pou) per a fer l'experiment en una placa de cultiu de 24 pous
3. Plaquejar un número adequat de cèl·lules per pouet i incubar 24h (aproximadament) per a començar amb la immunocitoquímica

5.3.7.6.2. Fixació

Protocol:

1. Aspirar el medi i rentar amb PBS (Sigma-Aldrich)
2. Cobrir les cèl·lules amb una solució de paraformaldehid al 4% per a fixar-les, durant 20min a temperatura ambient
3. Aspirem la solució de fixació i afegim PBS per fer un rentat ràpid
4. Aspirem el PBS i afegim PBS nou per fer un rentat ràpid
5. Aspirem el PBS i afegim PBS durant 5 min

5.3.7.6.3. Permeabilització

Protocol:

1. Cobrim les cèl·lules amb solució de permeabilització Tritó X-100 al 0.5% en PBS i incubem durant 2min a temperatura ambient
2. Aspirem la solució de permeabilització i afegim PBS per fer un rentat ràpid
3. Aspirem el PBS i afegim PBS nou per fer un rentat ràpid
4. Aspirem el PBS i afegim PBS durant 5min

5.3.7.6.4. Bloqueig d'unions inespecífiques

Protocol:

1. Traiem els vidres de la placa de cultiu amb cura de no trencar-los i sempre tenint present en quina cara del vidre tenim les cèl·lules
2. Col·loquem els vidres en una superfície plana, per exemple la tapa de la placa de cultiu
3. Realitzem el bloqueig de les unions inespecífiques amb la solució de bloqueig o la solució diluent d'anticòs (DAKO antibody diluent solution) i deixar 1h a temperatura ambient en una càmera humida
4. Submergir les mostres en PBS 1X durant 5min
5. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.6.5. Incubació amb l'anticòs primari

Protocol:

1. Assecar els portes amb les mostres i treure l'excés de PBS, evitant que s'assequin del tot les mostres
2. Preparar els anticòs primaris diluint-los en solució de bloqueig o en solució diluent d'anticòs (DAKO antibody diluent solution) i afegir a les mostres
3. Deixar 2-3h a temperatura ambient en una càmera humida
4. Eliminar la dilució de l'anticòs primari i submergir la mostra en PBS 1X durant 5min
5. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min
6. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.6.6. Incubació amb l'anticòs secundari

Protocol:

1. Assecar els vidres i treure l'excés de PBS, evitant que s'assequin del tot les mostres
2. Preparar els anticòs secundaris diluint-los en solució de bloqueig o en solució diluent d'anticòs (DAKO antibody diluent solution) i afegir a les mostres
3. Deixar 45min a temperatura ambient en una càmera humida
4. Eliminar la dilució de l'anticòs secundari i submergir la mostra en PBS 1X durant 5min
5. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min
6. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.6.7. Muntatge

Protocol:

1. Assecar els portes amb les mostres i treure l'excés de PBS, evitant que s'assequin del tot les mostres
2. Afegir a les mostres una gota de solució de Mowiol
3. Col·locar un cobreobjectes sobre la mostra
4. Pressionar suaument amb un paper assecant per eliminar l'excés de solució de muntatge i treure les bombolles que puguin quedar entre el portaobjectes i el cobreobjectes
5. Segellar amb pinta unges

6. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (ChIP)

La Immunoprecipitació de cromatina és un mètode bioquímic usat principalment per a determinar el lloc d'unió en el genoma de proteïnes d'interès com histones i factors de transcripció entre altres. Per a la realització amb èxit d'aquesta tècnica és essencial disposar d'un anticòs altament específic i eficient per la proteïna d'interès.

La CHIP consta bàsicament de dos passos, inicialment es fa un entrecruament amb formaldehid del DNA a les proteïnes unides a aquest en cèl·lules intactes, fixant així les interaccions proteïna-proteïna i les interaccions proteïna-DNA. El següent pas és la immunoprecipitació dels complexos proteïna-DNA amb anticossos específics a partir d'extractes prèviament sonicats, per a fragmentar la cromatina. Les seqüències específiques de DNA immunoprecipitades són llavors amplificades per PCR per a determinar si han estat o no enriquides en les mostres corresponents per a cada anticòs.

Protocol:

1. Crosslinking cèl·lules:
 - 1.1. Rentar les cèl·lules amb 10ml de DPBS 1x
 - 1.2. Afegir 9ml de 1% formaldehid i incubar 15min a temperatura ambient en agitació
 - 1.3. Neutralitzar la reacció afegint 1ml de 1,25M Glicina i deixar durant 3-5min
 - 1.4. Rentar dues vegades la placa amb DPBS 1x fred
 - 1.5. Afegir 1ml de DPBS i rascar les cèl·lules de la placa
 - 1.6. Centrifugar a 2000gx durant 5min a 4°C
2. Extracció de la cromatina
 - 2.1. Re-suspendre el pèl·let de cèl·lules amb 1ml de tampó de lisi I i incubar 10min en gel
 - 2.2. Centrifugar a 1000gx durant 5min a 4°C
 - 2.3. Re-suspendre el pèl·let de nuclis amb 300-400ul del tampó de lisi II i incubar 10min en gel
3. Fase de sonicació o fragmentació de la cromatina
 - 3.1. Sonicar per un total de 2 torns de 10min emprant un sonicador de ultrasons amb bany (Bioblock Scientific-Vibra Cell 75043) repartit en polsos de 15seg, amb 59seg de descans entre polsos amb una amplitud del 50%
 - 3.2. Centrifugar a 10.000gx durant 15min a 4°C
 - 3.3. Recollir sobrenedant *
 - 3.4. En aquest pas es pot congelar la cromatina i mantenir a -80°C per continuar un altre dia (es estable fins una setmana a 4°C) o continuar amb el protocol
4. Immunoprecipitació de la cromatina
 - 4.1. Diluir la cromatina amb tampó de dilució
 - 4.2. Quantificar cromatina mesurant l'absorbància a 260nm (DNA) amb Nanodrop
 - 4.3. Emprar 100-200µg per condició d'immunoprecipitació en un volum final de 500-1000µl. (**IMPORTANT:** Guardar una part de cromatina diluïda per utilitzar com a control de precipitació (input); 50ul si el volum d'immunoprecipitació és de 500µl)
 - 4.4. Afegir 2-5µg d'anticòs específic (en paral·lel tindrem un tub on immunoprecipitem amb anticòs control, IgG de l'espècie de l'anticòs específic)
 - 4.5. Incubar en rotació durant tota la nit a 4°C (aproximadament 16h)
5. Acoblar l'anticòs primari a les beads magnètiques (Dynabeads® Invitrogen)
 - 5.1. Afegir 25ml de *Dynabead* per condició prèviament rentades amb DPBS
 - 5.2. Incubar 2-3h en rotació a 4°C
6. Rentats
 - 6.1. Utilitzant el suport magnètic extreure el sobrenedant i rentar amb 1ml de tampó de rentat baix en sals deixant en rotació durant 4min
 - 6.2. Rentar amb 1ml de tampó de rentat alt en sals deixant en rotació durant 4min
 - 6.3. Rentar amb 1ml de tampó de rentat amb LiCl deixant en rotació durant 4min
 - 6.4. Rentar 3 vegades amb tampó TE deixant en rotació durant 4min en cada rentat
7. Elució
 - 7.1. Precipitar les *beads* amb el suport magnètic, treure sobrenedant i afegir 250µl de solució d'elució
 - 7.2. Incubar en rotació durant 15min a temperatura ambient
 - 7.3. Guardar el sobrenedant i repetir els dos passos anteriors
 - 7.4. Tenim un volum final de 500µl
8. Reversió del crosslinking
 - 8.1. En aquesta fase també afegim els inputs on per tenir el mateix volum que als eluïts afegim tampó d'elució fins arribar a 500µl
 - 8.2. Afegim 20µl de NaCl 5M a cada tub
 - 8.3. Incubar a 65°C 4-16 h

9. Digestió amb proteinasa K

9.1. Afegir : 20µl Tris pH 6,5 1M

10µl EDTA 0,5M

2µl proteinasa K 20mg/ml

9.2. Incubar durant 2h a 45°C

10. Recuperació del DNA immunoprecipitat

10.1. Purificar el DNA emprant el kit de columnes Quiquick (Qiagen)

***Comprovar la mida de la cromatina**

- 5µl extracte
- 35µl H₂O₂
- 1µl 0,5M EDTA
- 2µl proteinasa K

Mantenir 1h a 45 °C

Córrer en un gel d'agarosa al 1%. Mida normalment obtingut seguint aquest protocol: 0,2-2,0Kb.

Solucions utilitzades:Tampó de lisi I

- Hepes pH7,5 0,05M
- NaCl 0,14M
- EDTA 1mM
- Glicerol 10% (vol/vol)
- NP-40 0,5%
- Tritó-X-100 0,25% (vol/vol)
- Inhibidor de proteases 1x

Tampó de lisi II

- Tris pH8,1 50mM
- EDTA 10mM
- SDS 1% (pes/vol)
- Inhibidor de proteases 1x

Tampó de dilució

- Tris pH8 21mM
- EDTA 2,2mM
- NaCl 167mM
- Tritó-X-100 1,1% (vol/vol)
- SDS 0,01% (pes/vol)
- Inhibidor de proteases 1x (casa comercial)

Tampó de rentat baix en sals

- Tris pH8 20mM
- NaCl 150mM
- EDTA 2mM
- Tritó-X-100 1% (vol/vol)
- SDS 0,1% (pes/vol)

Tampó de rentat alt en sals

- Tris pH8 20mM
- NaCl 500mM
- EDTA 2mM
- Tritó-X-100 1% (vol/vol)
- SDS 0,1% (pes/vol)

Tampó de rentat amb LiCl

- Tris pH8 10mM
- LiCl 0,25M
- EDTA 1mM
- NP-40 1% (vol/vol)
- Deoxicolat de sodi 1% (pes/vol)

Tampó TE

- Tris pH8 10mM
- EDTA 1mM

Tampó d'elució

- SDS 1% (pes/vol)
- NaHCO₃ 0,1M

6.1. Anàlisi de les dades

El DNA immunoprecipitat va ser estudiat per PCR a temps real (Applied Biosystems 7900HT) per tal d'analitzar els fragments específicament precipitats amb els encebadors llistats a la taula annexa 1 amb el reactiu GoTaq Green Master Mix (Promega). El percentatge d'enriquiment relatiu al input es calcula tal i com es detalla a continuació:

$$2^{-(Ct_{\text{anticòs}} - Ct_{\text{input}})} - 2^{-(Ct_{\text{IgG}} - Ct_{\text{input}})}$$

7. MICROSCOPIA I MUNTATGE D'IMATGES DE MORFOMETRIA

Les imatges les prenem amb el microscopi de fluorescència (Leica DMI6000B) amb la funció multipàs (*multistep*) que ens permet captar una sèrie ordenada d'imatges de la zona desitjada d'un porta per després obtenir una imatge única.

Captarem la imatge del millor dels tres talls de cada profunditat (veure figura 27) per a cada animal. Analitzarem com a mínim dos portes diferents corresponents a 2 sèries diferents (per exemple A2 i C2) per als marcadors de progenitors endocrins i de proliferació, i un mínim de tres portes per a la quantificació d'hormones. Per tant, tindrem de 10 a 15 talls analitzats per a cada animal.

Per a això seleccionem l'àrea d'interès en el microscopi i captem les imatges. El *software* ens dona com a resultat imatges independents que nosaltres ordenarem amb l'ajut del programa d'anàlisi d'imatges MacBiophotonics ImageJ i generarem una imatge única (Image → Stack → Images to Stack → Make montage). Un cop tenim la imatge generada per un animal i per un dels marcadors, fem el mateix amb els altres marcadors de la mateixa àrea.

Un cop tinguem el muntatge de tots els marcadors per a cada tall tal i com s'observa en la figura 28, fusionarem les imatges per a tenir en una mateixa imatge tots els marcadors a analitzar (Image → Color → Merge channels).

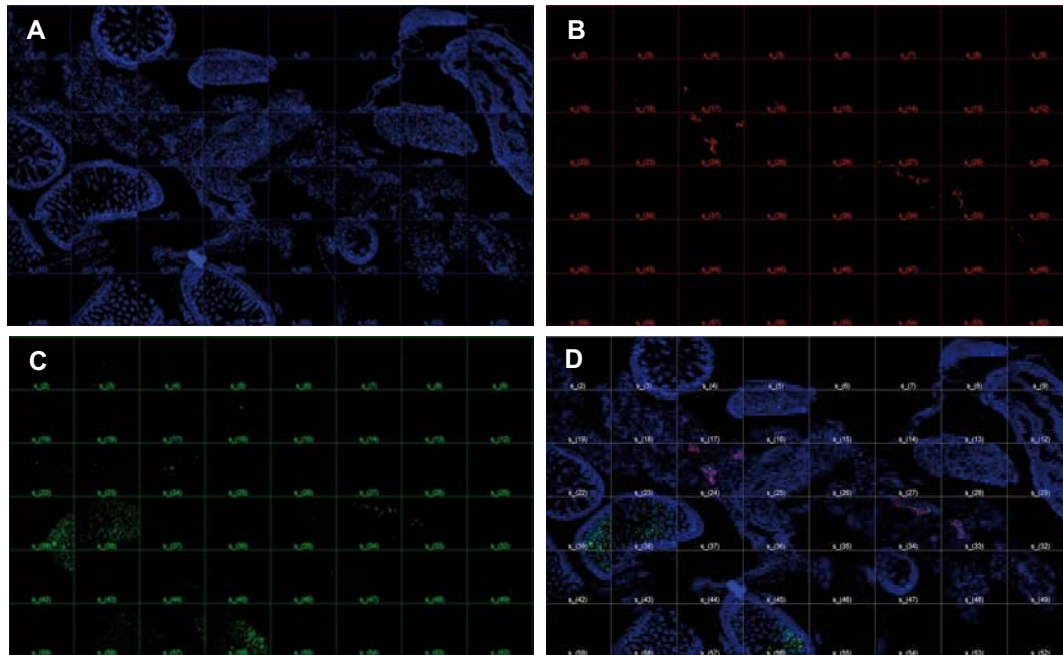


Figura 28. Esquema del muntatge d'imatges per a la morfometria. A) tinció de nuclis, B) tinció per a insulina, C) tinció per a glucagó i D) superposició dels tres muntatges

8. MODELS ANIMALS

El model animal emprat en aquesta tesi és el model de ratolí gen-anul·lat específic de pàncrees per Math6 (provinent del creuament d'animals Pdx1-Cre amb animals Math6-Floxed).

8.1. Genotipatge

8.1.1. Extracció de DNA genòmic

Amb l'objectiu de poder genotipar els animals agafem un tros de teixit del qual n'extraurem el DNA amb l'ajut d'una resina quelant (Chelex® 100 Resin, Bio-Rad). En el cas dels animals adults tallarem un trosset de cua d'aproximadament 2-3 mm de llargada, i pel que fa als embrions agafarem tota la cua.

Protocol:

1. Submergim el tros de teixit en la solució de digestió en un volum de 200µl i ho deixarem a 37°C tota la nit
2. L'endemà remenem bé el teixit digerit fent un vòrtex, i centrifuguem la mostra amb l'objectiu de baixar la resina i el teixit restant al fons del tub
3. Per a fer la PCR agafarem el sobrenedant, evitant agafar les restes de resina

Solucions utilitzades:

Solució de digestió:	
Chelex® 100 Resin	200µl
Proteinasa K (20mg/µl)	1µl
Tween20 (10% en PBS).....	2µl

8.1.2. Amplificació de DNA (PCR convencional)

Per testar si els animals són KO hem de fer dues amplificacions diferents, una per a la recombinasa (Pdx1-Cre) i l'altra per als al·lels floxejats. Per tant, necessitem 4 encebadors diferents (taula annex) i la barreja 1X ReddyMix™ PCR Master Mix (Thermo Scientific). Després haurem de separar les bandes emprant un gel d'agarosa explicat en l'apartat 2.1.4. (fig.29).

Protocol:

- Afegir a un tub de 0,2 ml:

1X ReddyMix™ PCR Master Mix (Thermo Scientific)	10µl
Encebador 5' (10µM)	0,5µl (200nM)
Encebador 3' (10µM)	0,5µl (300nM)
H ₂ O	1µl
DNA	1 µl*

 *volums variables
- Mesclar i centrifugar breument per baixar el contingut
- Introduir en el termociclador aquestes condicions:

94°C-----	2min 40s
38 cicles (al·lel floxejat) 33 cicles (Pdx1-Cre) de:	
94°-----	20s (fase de desnaturalització)
59-----	30s (fase d'anellament)
72°C-----	1m (fase d'extensió)
72°C-----	10min
4°C-----	∞

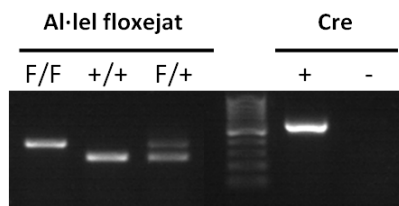


Figura 29. PCR genotipatge animals gen-anul·lats específics de pàncrees per Math6. A l'esquerra del panell es mostra les diferents possibilitats d'un animal de contenir cap, un o dos al·lels floxejats en el gen de Math6. A la dreta del panell la presència o absència de la recombinasa Cre. El marcador de pes molecular de 100 pb mostra de forma més brillant la banda corresponent a 500pb. Al·lel floxejat=400pb; al·lel salvatge=300pb; Cre=600pb.

8.2. Determinació de glicèmia i pes del pàncrees d'animals P1

Protocol:

- Recollim els animals a les poques hores de néixer
- Els sacrificuem per decapitació i recollim una gota de sang per a mesurar la glicèmia amb el glucòmetre (Accu-Check, Roche)
- Es disecciona el pàncrees i es pesa en una balança de precisió

8.3. Test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (IPGTT)

Amb aquest test es valora principalment la capacitat del pàncrees a l'hora de secretar insulina després d'una estimulació amb glucosa, alhora que també la participació dels teixits perifèrics en la captació de glucosa en sang fins arribar als valors de normoglicèmia.

Protocol:

1. Dejunar els animals 5-6h abans de començar l'assaig
2. Injectar glucosa, via intraperitoneal, en forma de glucosa al 40% (sèrum glucosat hipertònic al 40%, Fresenius Kabi) a una dosi equivalent a 2g de glucosa/ Kg de pes de l'animal
3. Fer un petit tall a la punta de la cua de l'animal (aproximadament d'1mm de longitud) i fer un massatge a la cua per ajudar a que surti la sang
4. Mesurar la glicèmia en sang amb el glucòmetre (Accu-Check, Roche) a diferents temps. Els temps de mesura són a 0, 15, 30, 60 i 120 min després de la injecció de glucosa. De forma paral·lela a cada temps recollim plasma dels animals per capil·laritat amb un microvette (tub capil·lar amb EDTA) (Sarstedt)
5. Centrifuguem les mostres a 3500rpm durant 20min a 4°C per separar eritròcits, leucòcits i plaquetes
6. Agafem el plasma i el guardem en un nou tub a -80°C fins a la seva utilització
7. Mesurem les insulínemies utilitzant la tècnica (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Mouse Insulin ELISA Mercodia)

8.4. Aïllament d'illots de ratolí adult

Els illots de ratolí adult de 36 setmanes d'edat, s'han isolat amb l'objectiu de fer una posterior extracció de RNA per columna, tal i com està explicat a l'apartat 4.1.1., i poder mesurar canvis en el perfil d'expressió de diferents gens. A més a més, també hem valorat el perfil de secreció dels illots a alta i baixa glucosa.

Protocol:

1. Preparar un assecador en el fons del qual es col·loca un paper impregnat amb isofluorà (Abbot)
2. Introduir el ratolí en el compartiment superior de l'assecador fins que perdi el coneixement
3. Comprovar que l'animal està correctament anestesiats i procedir al desnucament d'aquest amb l'ajut d'unes pinces gruixudes
4. Rentar l'abdomen de l'animal amb etanol 70% per evitar que a l'hora de disseccionar els pèls interfereixin
5. Situar l'animal en posició decúbit supí, de manera que la cua queda en la part més distal
6. Amb l'ajut d'una lupa binocular (Leica), disseccionar l'animal obrint la cavitat peritoneal i apartar els òrgans fins localitzar el conducte biliar comú, també conegut com a colèdoc
7. "Clampar" el colèdoc en la seva part més distal, on connecta amb l'intestí
8. Realitzar un petit tall en la part proximal del colèdoc (part més propera al fetge) i inserir una cànula bisellada de plàstic unida a una xeringa de 27G
9. Injectar 2ml de solució A de col·lagenasa P (Roche) (1,5mg de col·lagenasa P (Roche)/ml Hank's Balanced Salt Solution (Sigma)), observant que el pàncrees s'infla
10. Extreure el pàncrees i col·locar-lo sobre una placa de Petri (Soria Genlab) i treure el greix i els nòduls limfàtics que haguem pogut recollir
11. Col·locar el pàncrees un cop netejat en un Falcon de 50ml (Deltalab) que conté 1ml de solució B col·lagenasa P (Roche) (3,0mg col·lagenasa P (Roche)/ml de Hank's Balanced Salt Solution (HBBS) (Sigma)). Col·locar 2 pàncrees per tub
12. Col·locar els tubs en un bany a 37°C amb una agitació moderada durant 6 min
13. Col·locar els tubs en gel
14. Homogeneïtzar el contingut dels tubs amb una pipeta de plàstic Pasteur (Deltalab)
15. Aturar la reacció de digestió amb una solució freda de HBBS amb BSA (Bovine Serum Albumin). Centrifugar a 100g durant 5min a 4°C
16. Eliminar el sobrenedant, afegir més solució HBBS-BSA i homogeneïtzar. Passar la mostra per un colador per eliminar els trossos de pàncrees que no s'han digerit
17. Tornar a centrifugar a 100g durant 5min a 4°C
18. Eliminar el sobrenedant i re-suspendre el pèl·let corresponent a 2 pàncrees en 10ml de solució Histopaque 1.119g/L (Sigma)

19. Afegir amb cura de no trencar les fases del gradient 10ml de Histopaque 1.089g/L (barreja 1:1 de Histopaque 1.119g/L (Sigma) amb Histopaque 1.077g/L (Sigma))
20. Afegir amb cura de no trencar les fases del gradient 10ml de solució HBSS-BSA freda
21. Centrifugar a 829g durant 20min a temperatura ambient
22. Recollir els illots de la fase intermèdia, on tenim el Histopaque 1.089/HBSS-BSA i els passem a un tub de 50ml nou
23. Afegim 20ml de solució freda HBSS-BSA
24. Centrifugar a 500g durant 5min a 4°C
25. Eliminar el sobrenedant
26. Repetir els passos de rentat del 23 al 25 una vegada

Transferir els illots a una placa de Petri i procedir a la pesca amb l'ajut d'una lupa binocular (Leica), distingint els illots per la seva forma esfèrica, color blanc i un marge refringent.

8.5. Estudis de secreció d'insulina en illots

Els estudis de secreció d'insulina es van realitzar amb animals de 36 setmanes controls i gen-anul·lats específics de pàncrees per Math6.

Protocol:

1. Pescar 8 illots i posar-los en un vial de secreció (tub cònic de 2ml), en el que hi ha 1ml de solució de secreció sense glucosa (realitzar triplicats per condició).
2. Introdur els vials de secreció en un vial de centelleig de 25ml i tancar-ho amb un parafilm
3. Introdur els vials de centelleig en una gradeta i situar-los al bany a 37°C amb agitació lenta
4. Incubar 30 min a 37°C
5. Obrir els vials de centelleig i treure el vial de secreció
6. Extreure el medi de secreció sense arrossegar cap illot amb l'ajuda d'una lupa binocular
7. Afegir 1ml de solució de secreció suplementada amb glucosa (concentració final de 2,8 o 16,7 mM)
8. Introdur el vial de secreció un altra vegada al vial de centelleig i posar-ho tot en una gradeta
9. Incubar 90 min a 37°C en el bany amb agitació lenta
10. Recollir el medi de secreció sense arrossegar els illots amb l'ajuda d'una lupa binocular i congelar fins al seu ús

Amb el medi de secreció recollit es mesura la insulina secretada (dilució 1:2 o no dilució per a les mostres en baixa glucosa (2,8mM) i de 1:8 a 1:10 per a les d'alta glucosa (16,7mM)) mitjançant un ELISA (veure apartat 8.7).

Solucions:

Medis de secreció

1. Solució I

NaCl (Serva)	2,68g (460mM)
H ₂ O	100mL
2. Solució II

NaHCO ₃ (Serva)	0,806g (96mM)
KCl (Merck)	0,149g (20mM)
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Sigma).....	0,0812g (4mM)
H ₂ O	100mL
3. Solució III

CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma).....	0,147g (10mM)
H ₂ O	100mL
4. HEPES (4-(2-hidroxiètil)-1-piperazinaetanosulfonato sòdic) 1M

HEPES-Na (Fluka).....	26,03g (1M)
H ₂ O	100mL

5. Glucosa 1M

D-(+)-Glucosa.H ₂ O (Merck).....	1,981g (1M)
H ₂ O	10mL

Solució de secreció sense glucosa

Solució I	25mL
Solució II	25mL
Solució III	25mL
HEPES 1M	2mL
BSA (albúmina de sèrum boví, Sigma)	0,5g
H ₂ O	23mL

Ajustar a pH 7,4

Solució de secreció a 2,8mM glucosa

Solució de secreció sense glucosa	10mL
Glucosa 1M	22µL

Solució de secreció a 16,7mM glucosa

Solució de secreció sense glucosa	10mL
Glucosa 1M	167µL

8.6. Determinació del contingut total d'insulina en illotsProtocol:

1. Els illots emprats per mesurar la capacitat secretora una vegada acabat el procés de secreció afegim 1ml de solució àcid-alcohol
2. Sonicació
3. Guardem els illots homogeneïtzats a 4°C durant tota la nit
4. L'endemà centrifuguem a 3000rpm durant 15min a 4°C, recollim el sobrenedant i el guardem en un nou tub a -20°C fins a la seva utilització
5. Mesurem el contingut d'insulina utilitzant la tècnica (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Mouse Insulin ELISA Mercodia) explicada al següent apartat

8.7. Determinació de la concentració d'insulina (ELISA)

Per valorar la quantitat d'insulina present en el plasma dels animals o la quantitat d'insulina secretada pels illots, hem utilitzat l'assaig per immunoabsorció lligat a enzims (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Mouse Insulin ELISA Mercodia).

Protocol:

1. Pipetegem 10µl de cada calibrador o recta estàndard (0; 0,2; 0,5; 1,5; 3,0; 6,5) en una placa de 96 pous
2. Pipetegem 10µl directe de la mostra per als plasmes i 10µl de la mostra d'illots a baixa glucosa i 10µl d'una dilució 1/8 d'illots a alta glucosa
3. Afegir 100µl de l'enzim conjugat a tots els pous
4. Tapar la placa amb un parafilm i incubar durant 2h a temperatura ambient i en agitació suau (700-900rpm)
5. Afegir 700µl de solució de rentat a cada pouet i descartar la solució de la placa per inversió
6. Repetir el cinquè pas 5 vegades
7. En l'últim rentat, colpejar la placa contra un paper assecant per ajudar a eliminar tot l'excés de líquid
8. Afegir 200µl de substrat TMB (tetrametilbenzidina) a cada pou i tapar la placa de la llum amb paper de plata
9. Incubar la placa 15min a temperatura ambient
10. Afegir 50µl de solució de parada a cada pou (aquesta solució conté àcid sulfúric, fent que canviï el pH i el color blau de la solució cap a color groc)
11. Agitar la placa suaument durant 5s a temperatura ambient per barrejar bé
12. Llegir la placa en un espectrofotòmetre per colorimetria (Synergy HT, BioTek) a una absorbància de 450nm

9. ANÀLISI BIOINFORMÀTIC: MICROARRAYS D’AFFYMETRIX

Una part important dels experiments desenvolupats en aquesta tesi parteixen de l’anàlisi de *microarrays* d’expressió destinats a desxifrar els efectes globals de la sobreexpressió i silenciament gènic (RNA d’interferència) de Math6 sobre el transcriptoma de les cèl·lules ductals pancreàtiques mPAC, en absència i/o presència de Neurog3. La meua aportació a aquests experiments s’inicia amb l’anàlisi i comprovació de les dades d’expressió obtingudes doncs els *microarrays* s’havien hibridat just abans de la meua incorporació al grup com estudiant predoctoral.

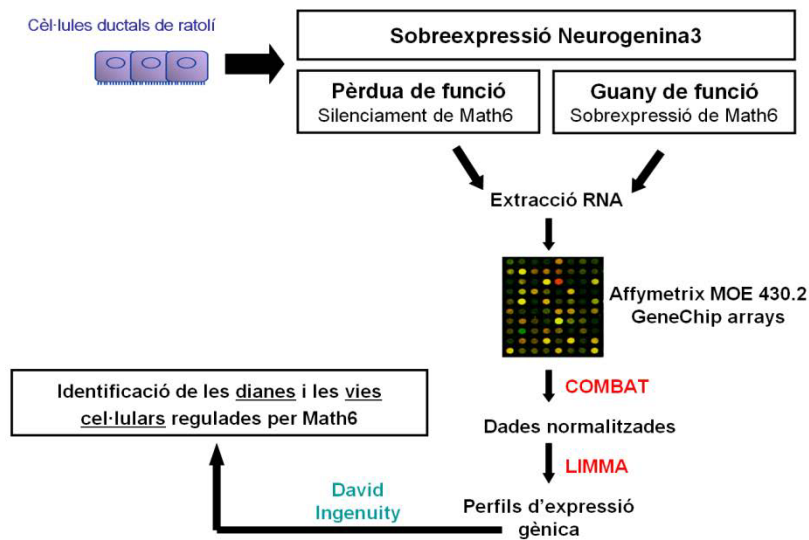


Figura 30. Esquema de la realització i anàlisi dels *microarrays* d’expressió en les aproximacions de guany i pèrdua de funció de Math6.

La sobreexpressió i silenciament de Math6 en el model de diferenciació endocrina de la línia cel·lular mPAC es va analitzar de forma separada, tot i ser aproximacions molt similars. Aquest fet recau a que les condicions basals en els dos tipus d’experiments són diferents: un shControl en el cas de la silenciament de Math6 i un Ad-βgal en el cas dels *microarrays* de sobreexpressió.

9.1. Microarrays

Es van emprar els GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array de la casa comercial Affymetrix. Es van utilitzar 3 *microarrays* per condició, cadascun dels quals correspon a RNAs obtinguts en experiments de sobreexpressió o silenciament independents. Aquests *microarrays* es basen en encebadors de 25 nucleòtids, amb un total d’11 encebadors per gen, amb una seqüència coincident a la regió 3’ del gen corresponent (coneguda amb el nom de PerfectMatch, PM). A més a més, per cada encebador n’hi

ha un d'ídentic excepte en el nucleòtid 13, la qual cosa ens permet valorar el soroll de fons degut a les unions inespecífiques (conegudes amb el nom de MisMatch, MM). L'agrupació dels 22 encebadors es coneix com Probe Set, contenint el *microarray* 45000 Probe Sets, que ens va permetre analitzar el nivell d'expressió de 39000 transcrits i variants d' aproximadament els 34000 gens ben caracteritzats que conté el genoma del ratolí.

La hibridació dels arrays es va realitzar a la Plataforma de Genòmica Funcional d'IDIBAPS sota la coordinació del Dr. Pedro Jares.

9.2. Controls de qualitat i normalització de les dades dels microarrays

L'anàlisi inicial dels resultats dels microarrays incloent tant els controls de qualitat com la normalització de les dades van ser realitzats pel Dr. J. Altirriba (IDIBAPS). Breument, l'ajust del soroll de fons, normalització i tractament de totes les dades es va realitzar mitjançant el Robust Multi-array Analysis (RMA) [133] i emprant el paquet de software Affy [134] disponible a través de Bioconductor (www.bioconductor.org). Per reduir la variabilitat en els microarrays de sobreexpressió, les dades normalitzades van ser ajustades també per lot d'experiment, és a dir, com es van realitzar tres experiments diferents es van tractar individualment amb el paquet de programes ComBat [135]. Finalment per detectar els gens diferencialment expressats, les dades processades i ajustades es van analitzar amb el paquet de programes LIMMA [136]. La selecció dels gens diferencialment expressats entre les diferents condicions es basa en un model lineal, el qual és diferent per als experiments de sobreexpressió i silenciament, degut a la diferent naturalesa dels experiments:

Arrays sobreexpressió:

$$Y_{ig} = \mu_g + \text{No-infectades}_i + \text{Ad-Math6}_i + \text{Ad-Neurog3}_i + \text{Ad-}\beta\text{gal:Ad-Neurog3}_i + \text{Ad-Neurog3:Ad-Math6}_i + \epsilon_{ig}$$

Arrays silenciament:

$$Y_{ig} = \mu_g + \text{shMath6}_i + \epsilon_{ig}$$

$i=1,2$ (tractament o no tractament (control))

$g= 1 \dots 45000$ (gens estudiats)

Es van considerar gens diferencialment expressats aquells que mostraven un valor p ajustat inferior a 0,05.

9.3. Classificació funcional dels gens diferencialment expressats

Un cop obtinguts els llistats de gens diferencialment expressats entre les diferents condicions estudiades, es va procedir a realitzar una classificació funcional en base a tres dominis: quin tipus de

component cel·lular és, quina funció molecular realitza i a quin procés biològic correspon. Aquest tipus d'eines faciliten molt l'anàlisi de dades i l'extracció d'informació de les diferents possibles funcions d'un gen específic. La classificació funcional es va fer en base a les bases de dades Ingenuity i David [137].

10. ESTADÍSTICA

Les dades en les gràfiques s'expressen com a mitjana dels valors en el grup \pm la seva Sem (Standard error mean, mitja de l'error estàndard). Les dades es consideren significatives quan després d'aplicar un test de t-Student es va obtenir un p valor inferior a 0,05.

IV. RESULTATS

1. CARACTERITZACIÓ DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DE MATH6

Math6 té un domini bHLH molt similar als dominis bHLH dels factors pro-endocrins Neurog3 i NeuroD1, els quals funcionen com potents activadors transcripcionals [69]. No obstant, resultats previs del nostre grup indiquen que 1) Math6 no comparteix amb Neurog3/NeuroD1 la capacitat d'activació de gens de diferenciació endocrina i 2) Math6 té una activitat intrínseca de repressor transcripcional en cèl·lules ductals pancreàtiques [87]. Per tant, sembla ser que malgrat l'alta homologia de seqüència en el domini bHLH amb factors de la família Neurog/NeuroD (fig.31), Math6 té característiques funcionals úniques.

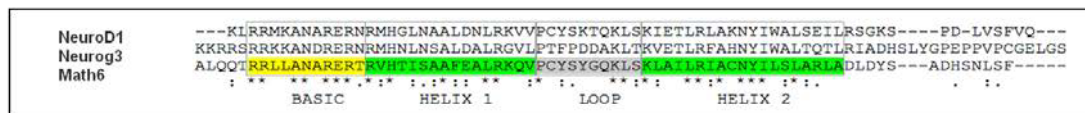


Figura 31. Alineament de les seqüències aminoacídiques dels dominis bHLH de NeuroD1, Neurog3 i Math6 de ratolí emprant el programa Clustalw que demostra una homologia de seqüència del 40-60% entre aquestes tres proteïnes.

Interessantment, Math6 no conté dominis repressors típics de la família bHLH com el domini orange o el motiu WRPW característics de la subfamília bHLH Hes [138]. D'altra banda, presenta un domini bàsic d'unió a DNA, fet que el diferencia dels repressors bHLH de la subfamília ID. En canvi, estudiant la seqüència de Math6 hem vist que conté un domini ric en prolines (PRR) el qual s'ha associat a activitats repressores en factors no bHLH com p53 o la família de proteïnes Hex [139, 140] (fig.32). Aquesta regió rica en prolines es troba situada entre l'aminoàcid 121-190, i té un densitat prolínica del 31% mentre que la global per tota la proteïna és del 12%. La regió rica en prolines es conserva en el seu ortòleg a *Drosophila*, el gen *net* [83].

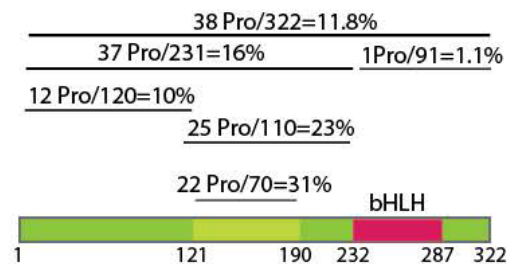


Figura 32. Distribució prolínica al llarg de la seqüència proteica de Math6

Els experiments inclosos en aquest objectiu són necessaris per a comprendre el mecanisme d'acció de Math6. A més a més, aporten informació novedosa sobre aquest factor ja que no existeix cap estudi publicat al respecte. Cal recordar que Math6, tot i pertànyer a la superfamília de factors de transcripció bHLH, és una proteïna molt poc coneguda.

1.1. Capacitat de transactivació de caixes E canòniques

Els factors bHLH s'uneixen en forma de dímers (homo- o heterodímers) a motius de DNA coneguts com a caixes E (seqüència canònica: CANNTG) a través dels seus dominis bàsics d'unió a DNA. A fi d'establir la capacitat de Math6 per transactivar caixes E canòniques, hem emprat vectors reporter artificials que expressen el gen de la luciferasa sota el control d'un promotor mínim precedit per 3 caixes E en tàndem. Hem estudiat un total de 10 vectors diferents corresponents a totes les combinacions de seqüència possibles (amablement cedits per Dr.Kroll, Washington University School of Medicine), tant a la línia ductal pancreàtica mPAC com a la línia fibroblàstica NIH3T3.

Hem vist que Math6 no transactiva cap dels 10 vectors analitzats ni a les cèl·lules mPAC ni a les cèl·lules NIH3T3. En canvi, Neurog3, i en menor grau NeuroD1, activen moderadament les caixes GA, GC i TA en ambdós contextos cel·lulars. Per altra banda, la proteïna E E47 (que pot actuar tant com a homodímer com heterodímer amb bHLH específics de teixit) té efectes molt potents sobre GA i GC, sobretot a les cèl·lules mPAC (fig.33).

Degut a que els bHLH específics de teixit s'uneixen a DNA com a dímers amb proteïnes E ubiqües, és possible que els efectes moderats que hem observat anteriorment amb les proteïnes estudiades sigui a causa de la limitada disponibilitat de proteïnes E endògenes. Per tant, en la segona tanda d'experiments, el que hem fet és combinar els 3 bHLH estudiats amb la proteïna E E47, la qual es coneix que forma dímers d'alta activitat amb Neurog3 i NeuroD1. La figura 34 ens mostra que no s'observen sinèrgies entre E47 i Math6 en cap de les caixes estudiades, a diferència de l'observar amb Neurog3 i NeuroD1 en ambdues línies cel·lulars. La caixa GC és per la que E47 mostra màxima activitat en les mPAC. La introducció de Math6 o NeuroD1 en el sistema té un efecte inhibitor sobre l'activitat d'E47 que no s'observa amb Neurog3, el que suggeriria que Math6 i NeuroD1 recapten E47 però no s'uneixen a aquesta caixa E, o si ho fan, l'heterodímer té una activitat activadora transcripcional menor que la del homodímer E47/E47. El mateix perfil s'observa amb les NIH3T3, però el grau d'activació de l'homodímer E47/E47 és molt menor. Pel que fa als heterodímers E47/Neurog3, observem sinèrgies amb les caixes GA, GC i TA, però només amb la caixa TA en les cèl·lules mPAC. En el context de la caixa TA, Math6 afecta de forma significativa l'activació del vector

reporter en resposta als heterodímers E47/Neurog3, disminuint la seva resposta a les cèl·lules mPAC de forma significativa i en menor grau a les NIH3T3.

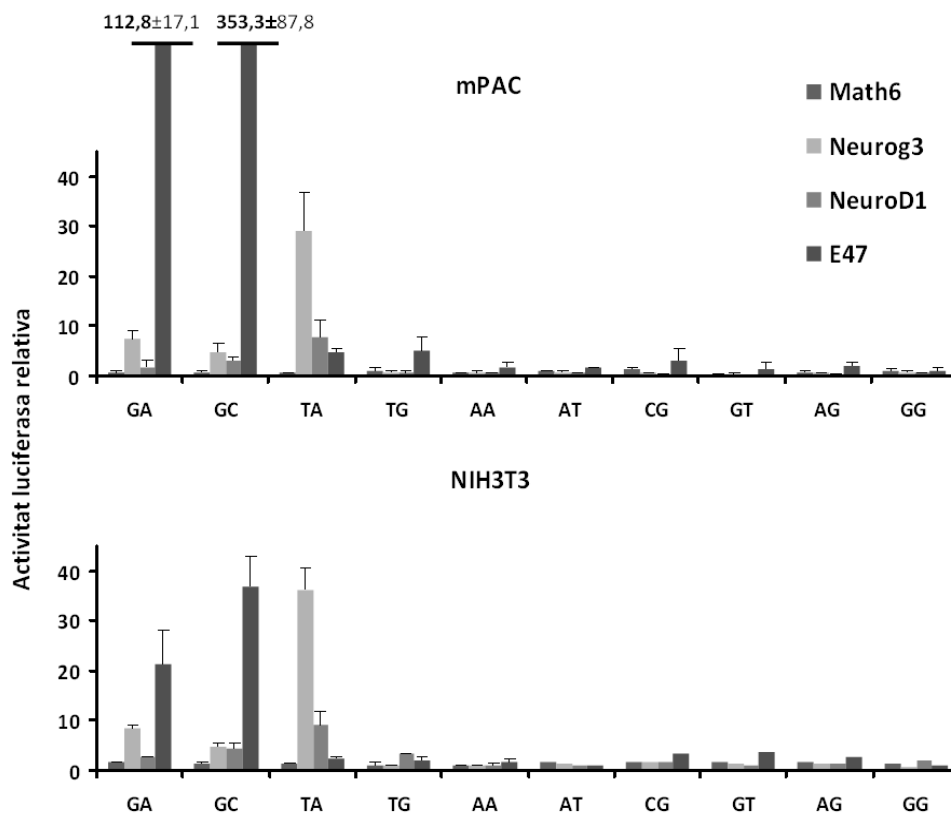


Figura 33. Math6 no transactiva cap caixa E canònica en assajos de luciferasa. 10 ng de vector d'expressió codificant per Math6, Neurog3, NeuroD1 i E47 van ser cotransfectats amb 125 ng de vector reporter de luciferasa (10 vectors diferents corresponents a les 10 caixes E (CANNTG) possibles, a la figura es mostren el nucleòtids centrals) i 5 ng del vector reporter control (Cytomegalovirus promotor-Renilla reniformis luciferase) en cèl·lules mPAC i NIH3T3 en plaques de 96 pouets. Les activitats relatives es calculen a partir de l'activitat mostrada pel vector buit (control) normalitzat a 1. (N=4 per triplicat). Resultats són Mitjana±Sem.

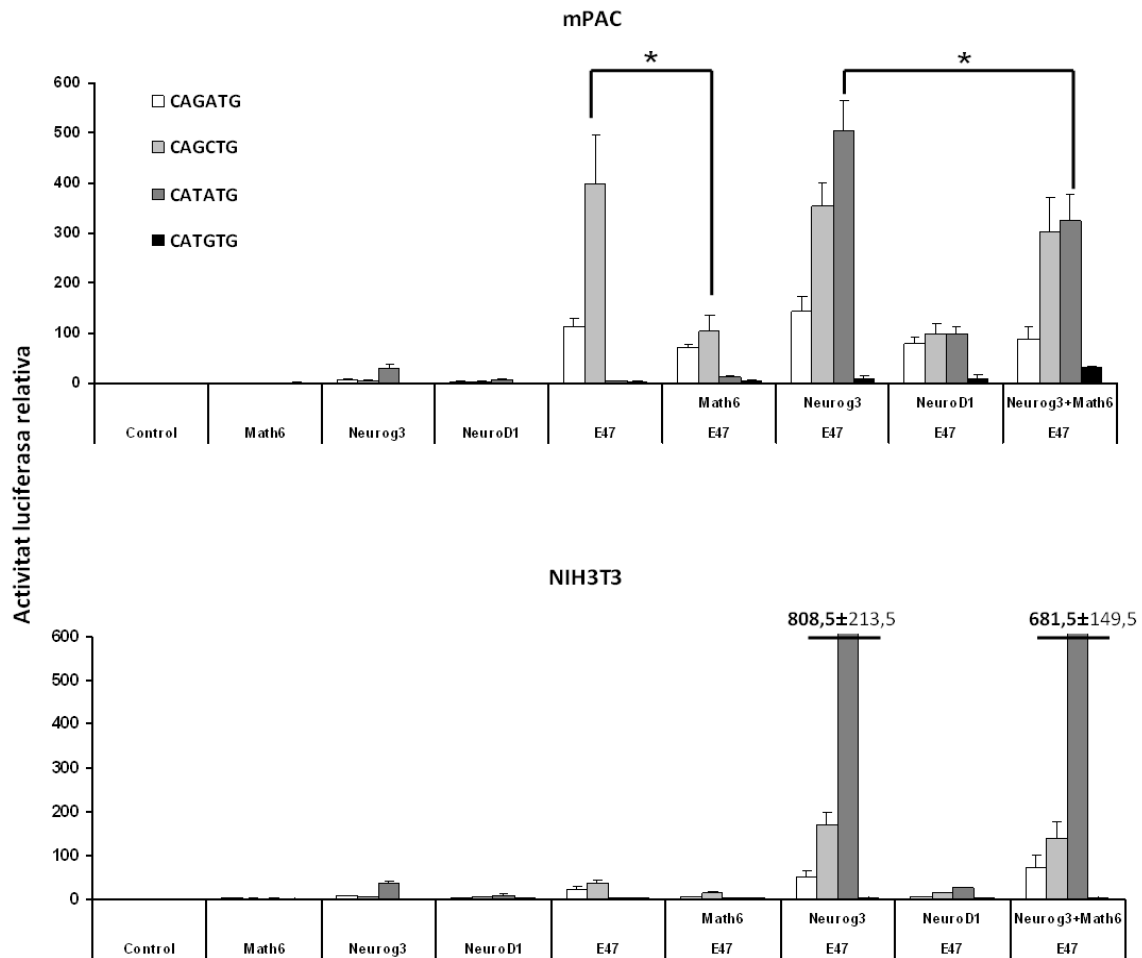


Figura 34. Math6 inhibeix l'activitat transcripcional de determinats homo- i heterodímers de factors bHLH. 10 ng del vector d'expressió codificant per Math6, Neurog3, NeuroD1 i/o E47 van ser co-transfectats amb 125 ng de vector reporter de luciferasa (4 vectors diferents corresponents a les caixes E indicades a la figura) i 5 ng del vector reporter control (Cytomegalovirus promotor-Renilla reniformis luciferase) en cèl·lules mPAC i NIH3T3 en plaques de 96 pouets. Les activitats relatives es calculen a partir de l'activitat mostrada pel vector buit (control) normalitzat a 1. * $P < 0,05$, test t-Student. (N=4 per triplicat). Mitjana \pm Sem.

En conjunt, aquests resultats indiquen que Math6, sol o en combinació amb E47, no pot transactivar caixes E canòniques. Aquest fet no sembla ser dependent de context cel·lular ja que en les dues línies cel·lulars assajades els efectes es reproduïxen seguint el mateix patró. Pel contrari, Math6 inhibeix de manera significativa l'activitat dels homodímers activadors E47/E47 en particular sobre les caixes CAGCTG, i la transactivació produïda pels heterodímers E47/Neurog3 sobre les caixes CATATG.

1.2. Caracterització dels dominis funcionals de Math6

Els resultats anteriors així com un treball previ del nostre grup suggereixen que Math6 pot actuar com a repressor transcripcional [87], de la mateixa manera que ho fa el seu ortòleg en mosca *net* [83]. Amb els següents experiments hem intentat esbrinar els dominis funcionals de Math6 que són els responsables d'aquesta capacitat de repressió. A més a més, aquesta aproximació experimental ens permetrà també desemascarar possibles dominis activadors de la proteïna. Per estudiar la importància relativa de cadascuna de les regions de Math6 en la seva activitat transcripcional, hem creat proteïnes de fusió entre el domini d'unió al DNA Gal4 (Gal4 DBD) i diferents fragments de la proteïna de Math6. Després hem analitzat la seva capacitat de regulació de l'activitat transcripcional de vectors reporter que expressen el gen de la luciferasa sota el control de promotors que contenen llocs d'unió a Gal4 (UAS), aproximació coneguda amb el nom d'assajos *one hybrid*. Com que desconeixem les dianes gèniques naturals de Math6, vam considerar que el sistema *one hybrid* ens podria oferir informació rellevant sobre possibles interaccions amb altres proteïnes independentment de la seva unió a DNA (que ve mediada en els nostres constructes pel domini Gal4 DBD).

1.2.1. Construcció de proteïnes de fusió GAL4 DBD-Math6

Els diversos fragments de Math6 es van amplificar per PCR a partir d'un vector d'expressió existent ja al laboratori (que conté la seqüència codificant del Math6 de ratolí) emprant els diferents jocs d'encebadors de la taula annexa 1. Per als nostres estudis era necessari inserir aquests fragments en un vector d'expressió que contingués el domini heteròleg d'unió al DNA Gal4, i aquest ens el va proporcionar el vector d'expressió PM2 (Clontech) (fig.35). Les dianes de restricció emprades per clonar els diferents fragments de Math6 van ser *Sall* (5') i *HindIII* (3').

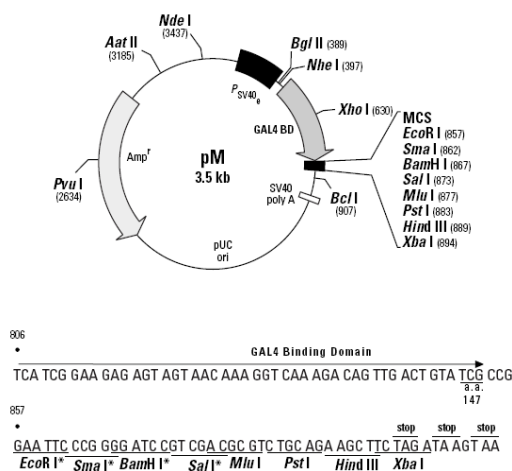


Figura 35. Vector d'expressió emprat per a la clonació i producció dels diferents fragments d'interès de Math6 per a l'estudi de la seva activitat transcripcional intrínseca.

Tots els vectors creats que es poden veure en la figura 36 van ser comprovats primer a nivell de seqüència de DNA, i després a nivell proteic mitjançant un westernblot emprant un anticòs contra el domini Gal4 per assegurar la seva fidelitat a la seqüència mare i la seva correcta traducció i expressió.

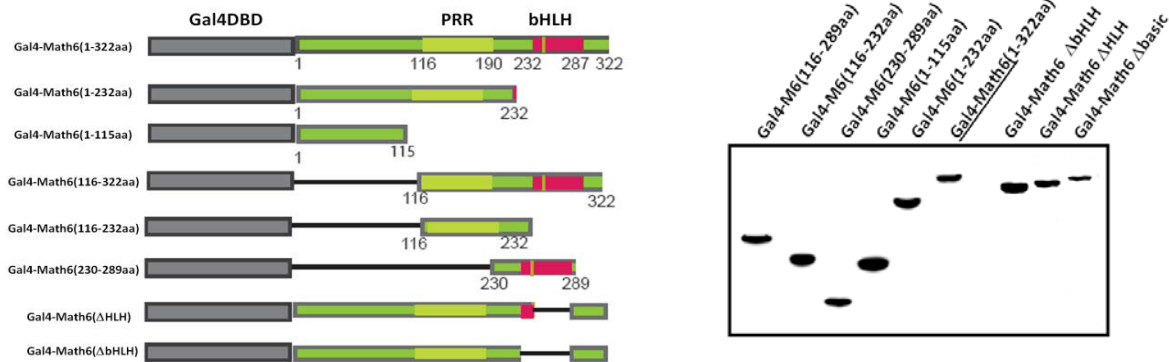


Figura 36. Representació esquemàtica dels constructes Gal4-Math6 generats i l'expressió de les proteïnes de fusió corresponents a les cèl·lules mPAC. Breument, les cèl·lules mPAC van ser transfectades amb els vectors mostrats a la figura i 48h després de la transfecció es van obtenir els extractes proteics totals. Aquests es van separar en un gel 10% SDS-PAGE, transferits en una membrana de nylon i incubats amb un anticòs anti-Gal4DBD. Gal4-Math6 sencer (1-322aa) de 66kDa aproximadament va ser utilitzat com a control (domini Gal4 té un pes aproximat de 24 kDa).

1.2.2. Activitat dels constructes Gal4-Math6

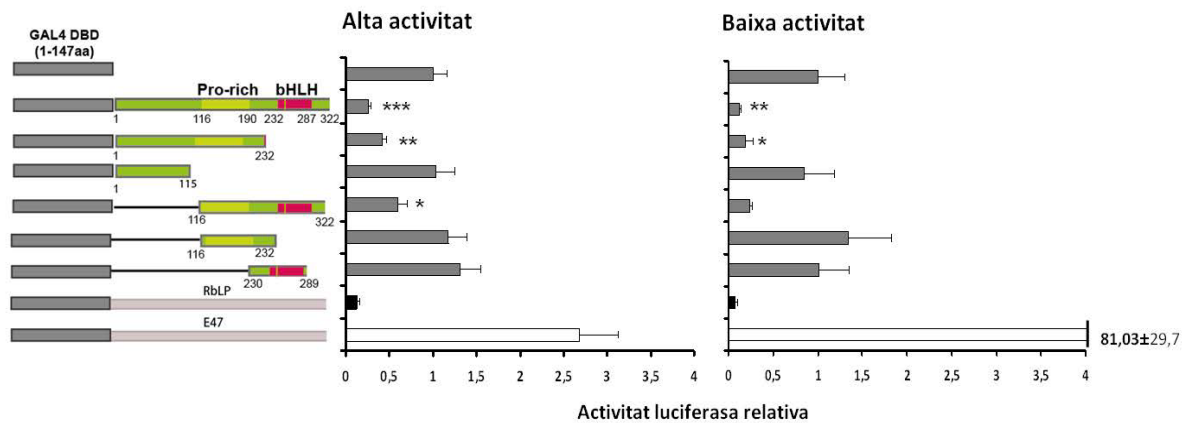
A continuació vam analitzar l'activitat transcripcional dels diferents constructes utilitzant el sistema *one hybrid* amb dos vectors *reporter* que expressen la luciferasa sota el control de 5 còpies del lloc d'unió de Gal4 (UAS), seguides d'un promotor mínim d'alta activitat basal (pG5FLpro, útil per veure repressions) o un altre d'un promotor de baixa activitat basal (pG5FLE1b, útil per veure activacions) a cèl·lules mPAC i NIH3T3 (fig.37). Com a controls, hem inclòs el potent repressor transcripcional Rbp1 (Retinoblastoma large pocket protein) i els activadors E47 i p300.

A les cèl·lules mPAC, Math6 produeix una repressió de casi 5 vegades de l'activitat del promotor d'alta activitat i de 10 vegades del de baixa activitat. La deleció de la cua carboxi-terminal i el domini bHLH (1-232aa) segueix reprimint ambdós promotors (fig.37 A). Per tant l'activitat intrínseca repressora de Math6 sembla ser independent del domini bHLH en aquest sistema. En canvi la resecció de la zona rica en prolins (PRR) d'aquest constructe provoca la pèrdua de l'activitat repressora. A les cèl·lules NIH3T3 (fig.37 B) Math6 també reprimeix l'activitat dels dos promotors estudiats si bé de manera més moderada que a les cèl·lules mPAC. Cal esmentar que l'eficiència de transfecció a les cèl·lules NIH3T3 és inferior que a les cèl·lules mPAC (40% vs 70% respectivament, dades no mostrades) i, per tant, no podem descartar que la repressió més feble sigui deguda a una

pitjor transfecció. De fet, el repressor Rb1p tampoc reprimeix el promotor d'alta activitat en aquestes cèl·lules. Malgrat això, observem que els diferents constructes de Math6 tenen efectes similars a les NIH3T3 i a les mPAC sobre el promotor de baixa activitat.

Per tal de determinar si la regió PRR posseeix capacitat repressora per sí sola, es va crear un constructe específic d'aquesta regió (116-232aa). No obstant, els resultats obtinguts mostren que aquest fragment per si sol no pot reprimir l'activitat de cap dels promotors estudiats. És possible que això sigui degut a canvis conformacionals d'aquest domini en absència d'altres parts de la proteïna que impossibiliten la seva interacció amb cofactors claus per l'activitat repressora. En canvi, el constructe Math6 116-322aa on hem eliminat tota la cua N-terminal mantenint la PRR i la cua C-terminal continua reprimint.

A



B

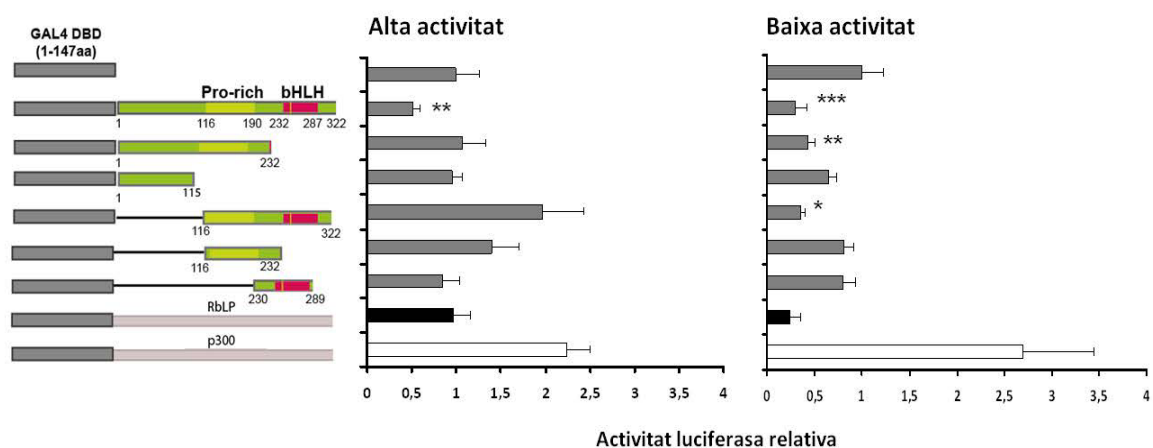


Figura 37. Activitat intrínseca repressora de Math6. A) 50 ng dels vectors d'expressió que codifiquen les diferents proteïnes de fusió de Math6 van ser co-transfectats amb 250ng del vector reporter luciferasa d'alta (pG5FLpro) o baixa (pG5FLE1b) activitat promotora (ambdós depenents de llocs d'unió a Gal4) i 5ng del reporter control (Cytomegalovirus promoter-Renilla reniformis luciferase) en plaques de 48 pouets en la línia cel·lular mPAC **B)** Mateixos assajos però en la línia cel·lular NIH3T3. Les activitats relatives es calculen a partir de l'activitat mostrada pel constructe amb el Gal4DBD aïllat (constructe superior) normalitzat a 1. (N=4 per triplicat). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001, test t-Student. Mitjana±Sem.

També hem estudiat el paper del domini bHLH en l'activitat transcripcional de Math6 creant constructes on hem eliminat diferents parts del domini (Δ basic, Δ HHL, Δ bHLH) mantenint intacta la resta de proteïna. Els resultats mostren com totes les proteïnes generades segueixen reprimint de forma significativa l'activitat del promotor d'alta activitat a les cèl·lules mPAC (fig.38). Per tant, el domini bHLH sembla ser prescindible per l'activitat repressora de Math6 en aquest sistema tal com ja suggerien els resultats obtinguts amb el constructe 1-232 aa.

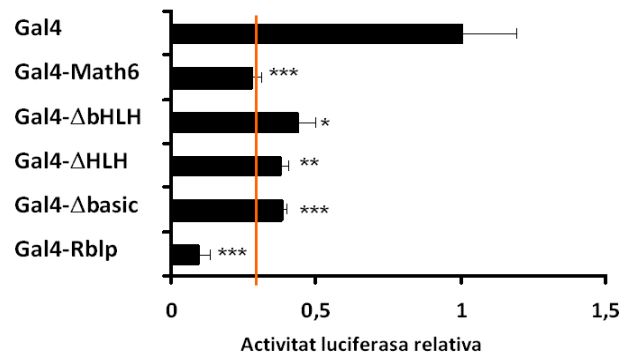


Figura 38. El domini bHLH és prescindible per l'activitat repressora de Math6. Mateixos experiments que la figura anterior amb el promotor d'alta activitat (pG5FLpro) emprant els constructes delecionant diferents parts del domini bHLH (N=4 per triplicat). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001, test t-Student. Mitjana \pm Sem.

En resum, els resultats d'aquests experiments mostren que la regió PRR és necessària per a que Math6 pugui actuar com a repressor transcripcional. En canvi, el domini bHLH sembla ser prescindible per aquesta activitat repressora. En cap cas, hem pogut desemascarar cap domini activador de Math6, suggerint que Math6 actuaria principalment com a repressor transcripcional.

1.2.3. Activitat dels Gal4-Math6 en presència d'altres factors bHLH

Emprant el mateix sistema *one hybrid* hem volgut analitzar possibles interaccions funcionals entre Math6 i altres proteïnes bHLH de manera independent a la seva capacitat d'unió al DNA (ja que ho faran mitjançant el domini d'unió al DNA Gal4 de Math6). Amb aquesta finalitat, hem estudiat els efectes de la transfecció combinada dels vectors Gal4-Math6 amb vectors d'expressió codificants per altres factors bHLH (pro-endocrins Neurog3 o NeuroD1, pro-neuronals Mash1 i el factor bHLH ubic E47). Inicialment vam estudiar els efectes de les diferents combinacions sobre els promotors de baixa i alta activitat. Els resultats eren similars però molt més evidents i reproduïbles amb el promotor de baixa activitat (recordem que és l'òptim per estudiar activadors transcripcionals), així que els resultats mostrats a continuació corresponen únicament als experiments realitzats amb aquest promotor.

La figura 39 ens mostra els resultats obtinguts en les cèl·lules mPAC, on s'observa com sorprenentment l'addició d'E47 fa que Math6 passi de reprimir a activar la transcripció del gen de la luciferasa. En canvi, Neurog3, NeuroD1 o Mash1 no tenen cap efecte sobre l'activitat repressora transcripcional de Math6, descartant una interacció funcional directa entre aquests factors i Math6. Amb les NIH3T3 (dades no mostrades) observem la mateixa tendència però amb un efecte molt més dèbil. L'activació produïda a les mPAC és de gairebé 100 vegades, mentre que a les NIH3T3 només és de 10 vegades.

A fi de caracteritzar millor l'aparent interacció entre Math6 i E47, vam analitzar els efectes d'E47 sobre l'activitat de diferents fragments de Math6 (fig.39). D'una banda, no vam observar cap efecte amb el constructe Gal4-Math6 1-232aa, el qual no conté el domini bHLH, indicant que l'activació observada amb la proteïna nativa depèn de la seva dimerització amb E47. D'altra banda, l'activació en presència d'E47 és idèntica entre el constructe sencer de Math6 i el constructe de menys de 100 aminoàcids Gal4-Math6 230-322aa, suggerint que el domini N-terminal de Math6 és prescindible per a la interacció funcional entre Math6 i E47. En canvi, s'observa que el constructe Gal4-Math6 230-322aa té una activitat molt més elevada que el constructe Gal4-Math6 230-289aa, posant de manifest que els 30 aminoàcids C-terminals de Math6 sí que tenen un paper important en la interacció d'aquest factor amb E47.

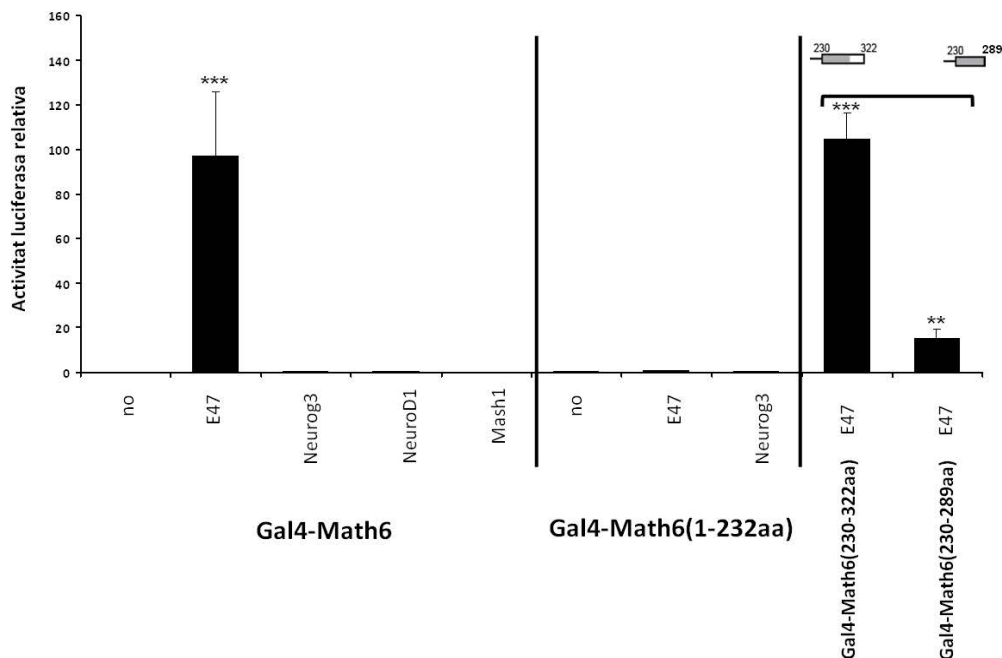


Figura 39. Interacció funcional entre Math6 i E47. 50 ng dels vectors d'expressió codificant per les proteïnes de fusió de Gal4-Math6 1-322aa, 1-232aa, 230-322aa i 230-289aa van ser cotransfectats amb 250 ng del vector reporter de baixa activitat (pG5FLE1b), 5 ng del reporter control (Cytomegalovirus promoter-Renilla reniformis luciferase) i 50 ng dels vectors d'expressió de Neurog3, NeuroD1, Mash1 o E47 en cèl·lules mPAC en plaques de 48 pouets. Les activitats relatives es calculen a partir de l'activitat dels vectors d'expressió Gal4 normalitzats a 1 (N=4 per triplicat). ** P < 0,01; *** P < 0,001, test t-Student. Mitjana±Sem.

A continuació, vam estudiar la interacció física entre Math6 i E47 suggerida en els experiments anteriors. Amb aquest fi, vam generar proteïnes recombinants per aquests dos factors, cadascuna portadora d'una etiqueta de seqüència diferent (HA per E47 i myc per Math6) amb extractes de reticulòcit de conill. Un cop generades i comprovada l'expressió d'aquestes proteïnes recombinants, les vam co-incubar per després determinar la formació de dímers mitjançant co-immunoprecipitació amb anticossos anti-HA i anti-myc. La formació d'heterodímers entre Math6 i E47 es va comprovar mitjançant westernblot tal com es mostra a la figura 40. En paral·lel i com a control d'aquests assajos, vam comprovar la interacció entre els factors Neurog3 (marcada amb FLAG) i E47.

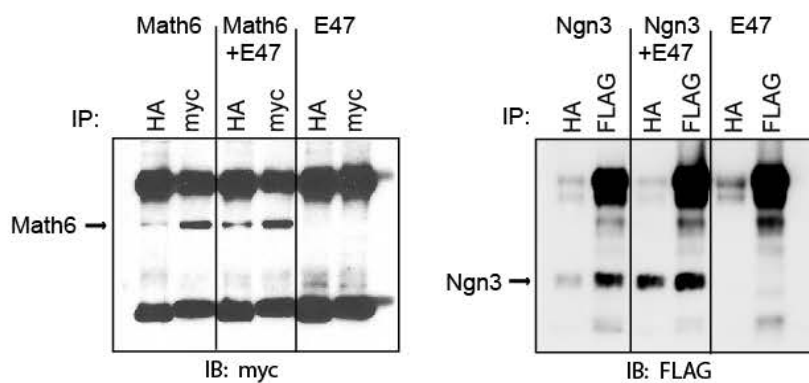


Figura 40. Interacció física entre Math6 i E47. Experiments de co-immunoprecipitació emprant proteïnes recombinants (myc-Math6, HA-E47 i FLAG-Neurog3) fetes en reticulòcit de conill i posterior anàlisi per immunoblot demostren la unió física entre Math6/E47 i Neurog3/E47. Imatges són representatives de 2-3 experiments independents.

Finalment, vam estudiar la situació reversa, és a dir, l'efecte de Math6 sobre l'activitat transcripcional de Gal4-E47 (en aquest cas, E47 és el que porta el domini Gal4 d'unió al DNA). Mentre que E47 ja activa la transcripció de forma clara per sí mateix tal com s'esperava, la presència de Neurog3, NeuroD1 i Mash1 incrementen de manera significativa aquesta activitat, fet que reflecteix la formació d'heterodímers altament activadors entre E47 i cadascun d'aquests tres factors. Per contra, Math6 inhibeix l'activació de Gal4-E47 exercint un efecte oposat a la resta de bHLH estudiats (fig.41). Cal recordar que havíem observat un efecte repressor similar en el context de caixes E natives (fig.34).

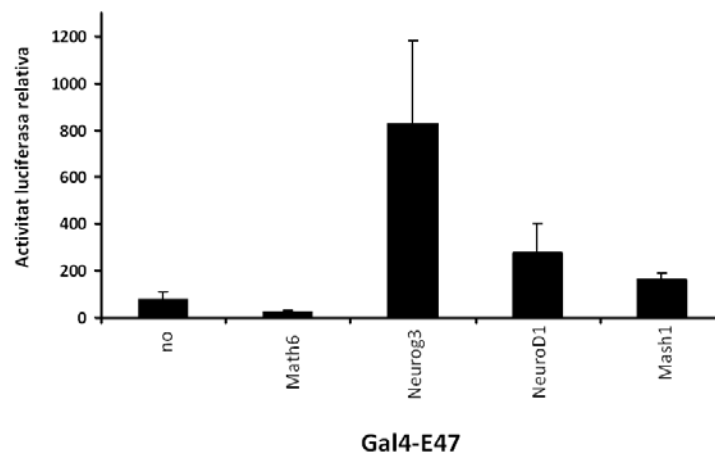


Figura 41. Math6 no dimeritza amb altres factors de transcripció bHLH. A) 50 ng dels vectors d'expressió codificant per la proteïna de fusió E47 (Gal4-E47) va ser co-transfectada amb 250 ng del vector reporter de baixa activitat (pG5FLE1b), 5 ng del reporter control (Cytomegalovirus promoter-Renilla reniformis luciferase) i 50 ng dels vectors d'expressió de Neurog3, NeuroD1, Mash1 o Math6 en cèl·lules mPAC en plaques de 48 pouets. Les activitats relatives es calculen a partir de l'activitat mostrada pel vector d'expressió Gal4 normalitzat a 1 (N=4 per triplicat). Mitjana±Sem.

En conjunt, aquests resultats mostren que Math6 pot dimeritzar amb E47 però l'heterodímer resultant Math6/E47 té una capacitat activadora més dèbil que la del homodímer E47/E47. A més a més, la presència de Math6 inhibeix l'activació dels homodímers E47/E47 possiblement limitant la formació d'aquests.

1.3. Efectes inhibitoris independents a la metilació o deacetilació

Hem estudiat la possible implicació de fenòmens d'acetilació i metilació en l'activitat trans-repressora de Math6 mitjançant l'ús de diferents compostos químics inhibidors de dits processos. El cribatge es va realitzar amb tricostatina A (TSA) i nicotinamida, inhibidors generals de deacetilases, i 5'-aza-2'-deoxycytidina i methyl-thio-adenosina com inhibidors generals de l'altre tipus d'enzims remodeladors de cromatina, les metil-transferases. La figura 42 mostra els resultats obtinguts amb diferents dosis de TSA, on Rb1p un inhibidor transcripcional ben caracteritzat es emprat com a control. Rb1p deixa de reprimir a la dosi més elevada de TSA, mentre que no observem cap efecte amb Gal4-Math6, conclouent que el mecanisme de repressió de Math6 a priori no actua per aquesta via. Les dades obtingudes amb la resta de compostos no són mostrats ja que els resultats van ser també negatius.

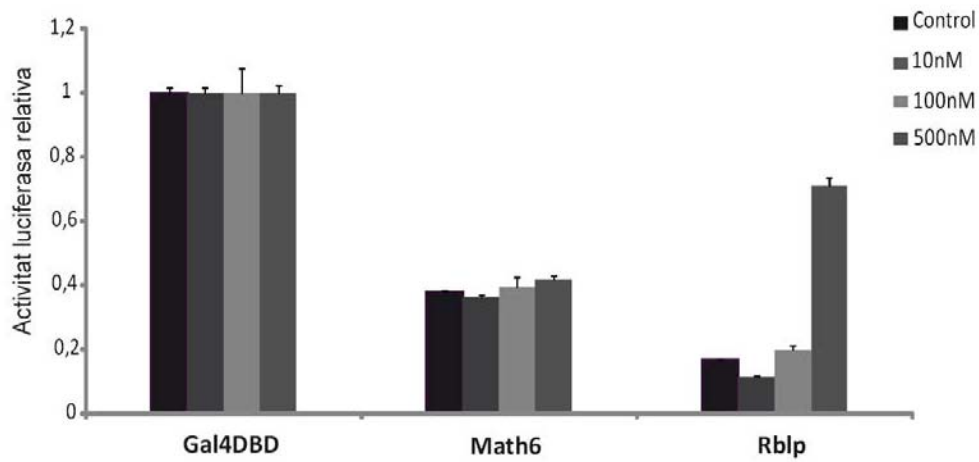


Figura 42. Els fenòmens de deacetilació no estan involucrats en l'activitat repressora de Math6. 50 ng dels vectors d'expressió codificant per Math6 o Rblp van ser co-transfectats amb 250 ng del vector reporter de luciferasa d'alta activitat (pG5FLpro) i 5 ng del reporter control (Cytomegalovirus promotor-Renilla reniformis luciferase) en cèl·lules mPAC en plaques de 48 pouets. Passades 4 hores de la transfecció es va afegir al medi la TSA. 24 hores després de la transfecció es va procedir a la recol·lecció i lectura de l'activitat del reporter. Les activitats relatives es calculen a partir de l'activitat mostrada pel constructe amb el Gal4 aïllat normalitzat a 1 (N=4 per triplicat). Mitjana±Sem.

2. IDENTIFICACIÓ DELS GENS DIANA DE MATH6 EN UN MODEL CEL·LULAR DE DIFERENCIACIÓ ENDOCRINA

Per determinar la funció d'un factor de transcripció és imprescindible conèixer els gens regulats per aquest, és a dir, els seus gens diana. Emprant *microarrays* d'expressió hem analitzat els efectes de la sobreexpressió i del silenciament gènic de Math6 a les cèl·lules ductals pancreàtiques mPAC. La figura 43 mostra l'esquema general del disseny experimental portat a terme per poder abordar aquest segon objectiu. El meu treball es va iniciar amb l'anàlisi i comprovació dels resultats dels *microarrays* que s'havien realitzat en el laboratori just abans de la meua incorporació, i va continuar amb l'estudi de les funcions cel·lulars identificades en els *microarrays* com a dianes potencials de Math6.

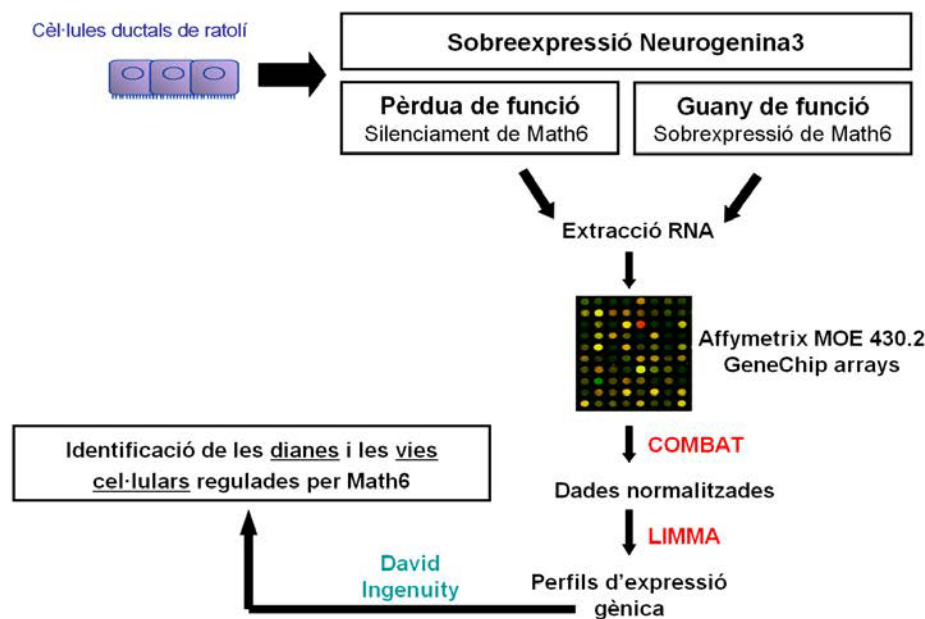


Figura 43. Hem emprat un model cel·lular de diferenciació endocrina basat en l'expressió de Neurog3 en cèl·lules ductals pancreàtiques (mPAC). Hem analitzat els efectes globals de la sobreexpressió i del silenciament gènic (RNA d'interferència) de Math6 sobre perfils d'expressió gènica en aquestes cèl·lules mitjançant *microarrays* d'expressió (Affymetrix MOE 430.2 GeneChip arrays (~45,000 sondes). S'han emprat un total de 3 arrays per condició estudiada. Les dades van ser ajustades utilitzant el software COMBAT i posteriorment analitzades amb el paquet estadístic LIMMA per veure els gens modificats de forma significativa. A més a més, es van utilitzar programes com el David o el Ingenuity per tal d'esbrinar a quines vies de senyalització pertanyien aquests gens.

La línia cel·lular emprada, les cèl·lules ductals pancreàtiques de ratolí mPAC, tenen la capacitat d'activar el programa de diferenciació endocrina en resposta a l'expressió ectòpica (mitjançant

adenovirus recombinants) dels factors bHLH pro-endocrins Neurog3 i NeuroD1 [69]. Aquesta característica ens permetrà d'una banda poder comparar la capacitat pro-endocrina individual de Math6 amb les de Neurog3/NeuroD1 però també establir les possibles interaccions funcionals entre Math6 i Neurog3 durant l'activació del programa de diferenciació endocrina. Tant per la sobreexpressió de Math6 com pel seu silenciament gènic hem emprat adenovirus recombinants que codifiquen pel cDNA de Math6 de ratolí (Ad-Math6) i per un shRNA específic de Math6 de ratolí (Ad-shMath6), respectivament.

2.1. Model de sobreexpressió gènica de Math6

En aquest primer apartat hem estudiat els esdeveniments regulats per Math6, analitzant els efectes d'expressar ectòpicament Math6 tot sol o en presència de Neurog3, prestant especial atenció a la potencial interacció funcional entre Math6 i Neurog3 prèviament suggerida [87].

2.1.1. Sobreexpressió de Math6

L'adenovirus recombinant emprat per sobreexpressar Math6 (Ad-Math6) ha estat descrit amb anterioritat [87]. En aquest mateix treball, s'havia comprovat que l'expressió de Math6 a les cèl·lules mPAC no era suficient per induir l'expressió de gens clau de diferenciació endocrina com *Pax4*, *Nkx2.2* o *NeuroD1*, els quals sí que eren induïts de manera significativa per Neurog3 o NeuroD1. Aquí vam voler ampliar aquesta anàlisi a escala genòmica per tal d'identificar possibles gens regulats per Math6 que no havien estat estudiats inicialment. Com a control vam utilitzar cèl·lules transduïdes amb un adenovirus que codifica pel gen de la β -galactosidasa (Ad-Bgal). A pesar dels alts nivells i de la localització correcta (nuclear) de Math6 aconseguits (fig.44), la magnitud dels efectes de Ad-Math6 sobre el transcriptoma de les cèl·lules mPAC són dèbils o gairebé nuls en comparació als efectes observats en resposta a Ad-Neurog3 en el mateix model. D'aquesta manera, emprant un factor de canvi de +/- 1,5, vam identificar únicament 14 gens activats i 0 gens reprimits significativament per Math6 (taula 6) en comparació amb 654 gens activats i 144 inhibits per Neurog3 (dades no mostrades). Entre els gens modificats per Math6, 6 són modificats per Neurog3 en el mateix sentit (activats) mentre que 3 ho estan en sentit contrari (inhibits). Cal destacar que entre els gens identificats no hem trobat gens característics o prèviament descrits en programes de diferenciació endocrina o pancreàtica.

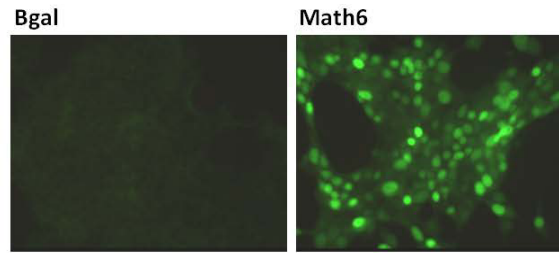


Figura 44. Les cèl·lules mPAC es van infectar amb un adenovirus control (Ad-Bgal) o un adenovirus que expressa Math6 amb una cua myc al seu extrem amino-terminal (Ad-Math6). 48h després de la infecció, es va detectar la proteïna de Math6 mitjançant immunocitoquímica emprant un anticòs anti-myc. La tinció obtinguda va ser clarament nuclear.

<i>Símbol</i>	<i>Gen</i>	<i>Sonda Affymetrix</i>	<i>FC Math6/ Bgal</i>	<i>FC Neurog3/Bgal</i>	<i>FC Bgal/no tractades</i>
MATH6 DIANES ESPECÍFIQUES					
<i>Cyr61</i>	Cysteine rich protein 61	1457823_at	1,8	1,1	0,7
<i>Mctp2</i>	Multiple C2 domains. transmembrane 2	1457707_at	1,6	1,0	1,2
<i>Ccdc80</i>	Coiled-coil domain containing 80	1424186_at	1,6	0,8	1,0
<i>chrb1</i>	Cholinergic receptor. nicotinic. beta polypeptide 1 (muscle)	1420682_at	1,5	1,0	1,2
<i>Atg9a</i>	ATG9 autophagy related 9 homolog B (S. cerevisiae)	1434092_at	1,5	1,0	0,9
MATH6/NEUROG3 DIANES COMUNES					
MATEIX EFECTE					
<i>Ptp4a3</i>	Protein tyrosine phosphatase 4a3	1418181_at	1,8	1,4	1,3
<i>Sulf2</i>	Sulfatase 2	1447602_x_at; 1430388_a_at	1,6	2,3	1,3
<i>Mybl1</i>	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	1456951_at	1,5	1,8	0,9
<i>Ano3</i>	Anoctamine 3/TMEM16	1443612_at	1,5	1,4	1,5
<i>Ivl</i>	Involucrin	1439878_at	1,5	1,6	0,8
	RIKEN cDNA 9230114K14 gene	1456643_at	1,5	1,5	1,3
EFECTE OPOSAT					
<i>Atp1a2</i>	ATPase. Na ⁺ /K ⁺ transporting. alpha 2 polypeptide	1443823_s_at	1,8	0,5	1,2
<i>Sprr2h</i>	Small proline-rich protein 2H	1422240_s_at	1,8	0,2	0,8
<i>Plxnb1</i>	Plexin B1	1435255_at	1,5	0,7	0,8

Taula 6. Gens expressats diferencialment entre les cèl·lules tractades amb Ad-Math6 i tractades amb Ad-βGalactosidasa (FC= Factor de Canvi).

Aquests resultats demostren que la sobreexpressió de Math6 *per se* no té efectes importants sobre el transcriptoma de cèl·lules ductals i confirma les dades anteriors on es postulava que Math6 per ell mateix no pot activar el programa de diferenciació endocrina i a més a més no funciona com un gen pro-endocrí *in vitro* en aquest model.

2.1.2. Sobreexpressió combinada de Math6 i Neurog3

Els efectes marginals de la sobreexpressió de Math6 sobre el transcriptoma de les cèl·lules mPAC podria estar relacionat amb la manca de cofactors necessaris per a la seva acció en aquestes cèl·lules. Alternativament, vam considerar la possibilitat que la presència d'alguns d'aquests factors i/o l'expressió endògena de gens diana de Math6 depengués de Neurog3. En aquest sentit, dades prèvies del grup mostren que la co-expressió de Math6 i Neurog3 porta al bloqueig significatiu de l'activació d'alguns gens endocrins, concretament *NeuroD1*, *Sst* i el de la pròpia *Neurog3* (autoregulació). De nou, vam voler ampliar aquestes observacions inicials amb un estudi a escala genòmica per tal de determinar l'abast de la interacció funcional entre Math6 i Neurog3. Es va comparar el transcriptoma de cèl·lules transduïdes amb Ad-Bgal+Ad-Neurog3 amb les cèl·lules transduïdes amb Ad-Neurog3+Ad-Math6. Els resultats obtinguts indiquen que la co-expressió de Math6 i Neurog3, bloqueja total o parcialment l'efecte activador de Neurog3 sobre un grup reduït de *locus* gènics, entre els quals es troben els gens demostrats prèviament *NeuroD1*, *Sst* i *Neurog3* (taula 7). Alguns dels altres gens reprimits per la Math6 són coneguts gens endocrins o tenen un paper ben establert en el desenvolupament pancreàtic com la *Pcsk1*, *Scrg2*, *Rab3c*, *Isl1* i *Tubb3*, fet que reforça un possible paper de Math6 durant la diferenciació endocrina.

Altres gens reprimits per Math6 no tenen una funció coneguda en el procés de diferenciació endocrina (*Slc38a5*, *Acs16*, *Coro2b*, *Miat*) però el fet que tots ells siguin dianes de Neurog3 suggereix la seva possible implicació en el programa de diferenciació dirigit per aquest factor pro-endocrí. Per exemple el transportador d'aminoàcids *Slc38a5* és interessant degut al seu enriquiment en el pàncrees en desenvolupament [141] i en progenitors Neurog3+ [142]. A més a més, aquest és un dels gens més reduïts en el pàncrees embrionari dels animals gen-anul·lats per Neurog3 [72].

En conjunt, aquestes dades reforcen el concepte que Math6 pot reprimir la funció pro-endocrina de Neurog3, si més no, ho fa sobre un grup reduït de gens a les cèl·lules mPAC, els quals només s'expressen en presència de Neurog3, no els trobem de forma endògena en aquestes cèl·lules.

Símbol	Gene	Sonda Affymetrix	FC Neurog3+Bgal/ Neurog3+Math6	FC Neurog3/ Bgal
<i>Slc38a5</i>	solute carrier family 38, member 5	1454622_at	3,1	3,9
<i>Neurog3</i>	neurogenin 3	1432034_at	2,8	11,0
<i>Acsf6</i>	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	1451257_at	2,3	2,6
<i>Miat</i>	RNA, mRNA-like noncoding RNA, partial sequence, clone: Gomafu isoform#1	1455325_at	1,7	2,1
<i>Sst</i>	somatostatin	1417954_at	1,6	2,1
<i>Coro2b</i>	coronin, actin binding protein, 2B	1434326_x_at	1,6	2,5
<i>Tubb3</i>	tubulin, beta 3	1415978_at	1,6	2,6
<i>Pcsk1</i>	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	1421396_at	1,6	3,2
<i>Isl1</i>	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain	1450723_at	1,5	2,1
<i>Rab3c</i>	RAB3C, member RAS oncogene family	1449494_at	1,5	1,7
<i>Scg2</i>	secretogranin II	1450708_at	1,5	1,8
<i>NeuroD1</i>	neurogenic differentiation 1	1426412_at	1,5	2,0
<i>Egr3</i>	early growth response 3	1436329_at	0,7	0,2
<i>Prl2</i>	prolactin family 2, subfamily c, member 2 /// prolactin family 2, subfamily c, member 3 /// prolactin family 2, subfamily c, member 4	1427760_s_at	0,7	0,2
<i>Spr2h</i>	small proline-rich protein 2H	1422240_s_at	0,6	0,2
<i>Ivl</i>	involucrin	1439878_at	0,6	1,6

Taula 7. Llistat de gens que tenen diferències significatives amb un percentatge de canvi (FC) $\geq 1,5$ o $\leq 0,7$ entre les cèl·lules infectades amb Neurog3+Bgal en comparació amb les infectades amb Neurog3+Math6. A la columna de la dreta s'indica l'efecte de Neurog3 sobre aquests mateixos gens. Math6 individualment no té efectes significatius sobre cap d'aquests gens.

2.1.3. Importància del domini bHLH de Math6 en la repressió de gens diana de Neurog3

Per tal de comprovar si la repressió d'aquest grup específic de gens requereix la unió de Math6 al DNA o és simplement conseqüència del segrestament de cofactors essencials per part de Math6, vam estudiar la co-expressió de Neurog3 amb Math6 al qual se li havia deletat el seu domini bHLH (Math6 1-232aa) o Math6 on només s'havia eliminat el domini bàsic d'unió al DNA (Math6 Δ Basic). La manca de tot el domini bHLH (Math6 1-232aa) ens mostra que gairebé en tots els casos el bloqueig eficient de la resposta a Neurog3 requereix la unió a DNA, fet que indica que aquest efecte no es deu únicament a una reducció de co-activadors transcripcionals disponibles per a Neurog3 en presència de Math6 (fig.45). Cal remarcar que per als gens diana *Neurog3*, *Sst* i *Rab3c* aquesta pèrdua d'inhibició és moderada, s'observa encara una inhibició del 30% aproximadament en tots els casos.

En referència a l'adenovirus Math6 Δ Basic, també observem una pèrdua generalitzada de la repressió en comparació amb la proteïna sencera de Math6. Per tant, el fet de no tenir el domini d'unió al DNA representa la pèrdua de l'efecte inhibitori de Math6 sobre l'activació de gens diana de Neurog3. Torna a ser moderada per *Neurog3*, *Sst* i *Rab3c*, però ampliem el grup aquesta vegada amb *Tubb3* i *Coro2b*.

En conclusió, aquests experiments demostren el requeriment del domini bHLH de Math6 en la repressió d'aquest grup de gens diana de Neurog3 en la línia cel·lular mPAC.

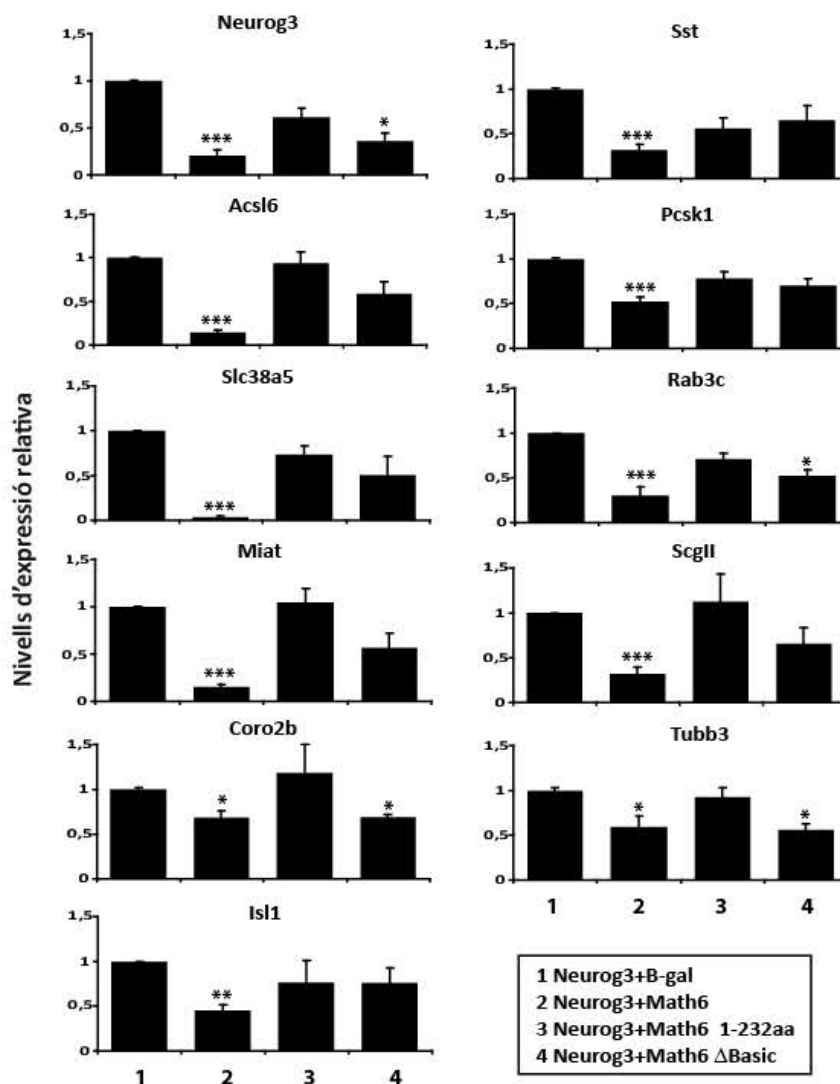


Figura 45. Validació per PCR a temps real dels gens significativament modificats en presència de Math6. Aquest gens són tots induïts per Neurog3 des de nivells indetectables en cèl·lules ductals control i la sobreexpressió de Math6 produeix el bloqueig de la seva inducció en resposta a Neurog3. Aquesta repressió es mediada pel domini bHLH o específicament pel domini bàsic d'unió al DNA de Math6, ja que l'eliminació d'aquests dominis produeix la pèrdua d'aquest efecte inhibitori. Les cèl·lules mPAC es van infectar amb els diferents adenovirus (el Math6 1-232aa i Δ Basic es van crear específicament per aquests experiments). Les expressions relatives es van calcular normalitzant a 1 la situació control (Neurog3+Bgal). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 vs Neurog3+Bgal. Test estadístic t-Student. (N=3-5) Mitjana \pm Sem.

2.1.4. Dinàmica d'activació dels gens diana de Neurog3 reprimits per Math6

Els gens de la *Sst* i *NeuroD1* són activats de manera tardana per Neurog3 a les cèl·lules mPAC, no es comencen a detectar fins 30h després del tractament de les cèl·lules mPAC amb Ad-Neurog3 [34]. Per contra, hi ha altres gens diana de Neurog3 que són induïts abans de les 24h de la introducció ectòpica de Neurog3 a les mPAC com *Pax4*, *Nxk2.2* o el mateix *Math6* [34]. A la figura 46, es mostra com l'activació del gen endògen de *Math6* es produeix tot just 12h després del tractament amb Ad-Neurog3. En base a aquestes observacions, ens vam plantejar si el conjunt de gens inhibits per Math6 compartien el perfil temporal d'inducció tardà descrit per *NeuroD1* i *Sst*. Efectivament, tal com mostra la figura 46, observem que tots els gens estudiats no són activats fins després de 24h del tractament amb Ad-Neurog3. Per tant, la sobreexpressió de Math6 sembla interferir de manera específica amb gens diana tardans de Neurog3.

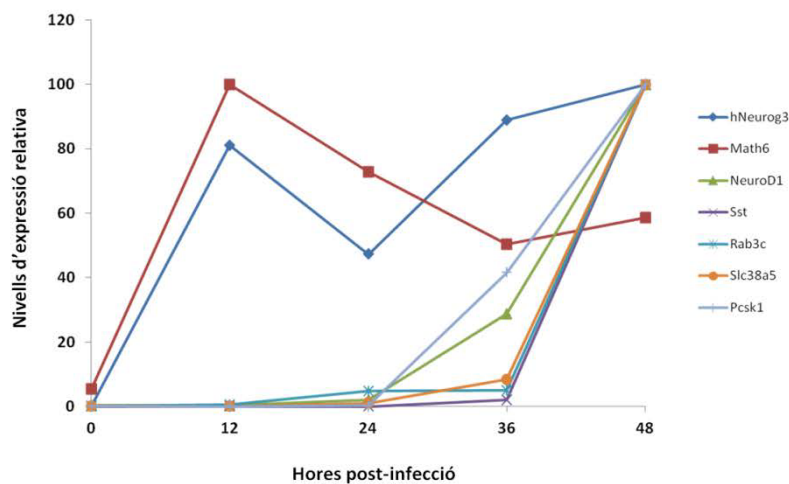


Figura 46. Expressió dels mRNAs dels gens indicats després de la infecció amb Ad-Neurog3 a les cèl·lules mPAC. S'ha donat el valor de 100% al moment en que s'assoleixen els nivells màxims de cada mRNA (Mitja de dos experiments).

2.1.5. Seqüències reguladores comunes als promotors dels gens l'activació dels quals és reprimida per Math6

Finalment, vam analitzar si les regions promotores dels gens l'activació dels quals és reprimida per Math6 tenien seqüències comunes, és a dir, si existeix un mòdul regulatori compartit per tots aquests gens que pugui explicar la seva co-regulació per Math6 i/o donar pistes sobre factors addicionals requerits per l'acció de Math6.

Per aquest estudi vam emprar el software Promoter Analysis Pipeline (PAP) (<http://bioinformatics.wustl.edu/webTools/PromoterAnalysis.do>). Per realitzar l'anàlisi, ens vam basar en el grup de gens bloquejats de manera més significativa per Math6 (*Neurog3*, *Slc38a5*,

Rab3c, *Acs16* i *Miat*). Aquest programa ens ha permès identificar una sèrie de motius d'unió al DNA compartit per aquest grup reduït de gens (taula 8). Entre els motius identificats hi ha caixes E, a les que s'unirien la proteïna E ubiqua E47 (recordem que E47 pot formar homodímers activadors de la transcripció i també heterodímers amb Neurog3 i Math6), i també el factor bHLH Tal1 àmpliament implicat en l'hematopoesi. Els altres dos motius identificats, corresponen a llocs d'unió de factors que se sap formen complexos amb heterodímers E47/Tal1 durant programes de diferenciació hematopoètics: el factor amb domini LIM Lmo2 i els factors GATA. Curiosament no detectem cap lloc d'unió per factors de transcripció endocrins en els gens estudiats.

Per tant, gràcies a aquest anàlisi informàtic i la prèvia identificació de dianes gèniques regulades per Math6, hem obtingut un major coneixement de les xarxes moleculars associades que permeten tenir un millor coneixement del mecanisme d'acció emprat per Math6 per executar la seva funció.

Factor de transcripció	P-value
Lmo2	0.0456
GATA-1	0.0515
Tal1beta-E47	0.0775
GATA-X	0.0793
GATA-1	0.0803
E47	0.0892

Taula 8. Factors de transcripció amb motius d'unió al DNA enriquits en el grup de gens sobreexpressats per Neurog3 i reprimits per Math6 identificats amb el programa PAP.

2.2. Model de silenciament gènic de Math6

A fi de determinar dianes gèniques d'un factor de transcripció concret, una alternativa a la seva sobreexpressió (o guany de funció) és la seva eliminació (pèrdua de funció), estratègia que en alguns aspectes hom pot considerar més fisiològica. Per aquest objectiu, vam emprar un adenovirus recombinant que codificava per un short hairpin de RNA específic per Math6 (Ad-shMath6). Aquest va ser co-infectat (o en dosis equivalents un adenovirus codificant per a un shRNA de seqüència aleatòria, Ad-shControl) amb Ad-Neurog3 (o un adenovirus control, Ad-Bgal) en les cèl·lules mPAC. Emprant aquest sistema, vam silenciar de forma efectiva l'expressió del mRNA de Math6 en un 70% (fig.47 A). A més a més, aquesta disminució en l'expressió de Math6 també la vam poder demostrar a nivell proteic (fig.47 B).

2.2.1. Efectes de shMath6 sobre l'activació de gens endocrins en resposta a Neurog3

La sobreexpressió de Math6 bloqueja l'efecte activador de Neurog3 sobre alguns dels seus gens diana com s'ha vist en l'apartat anterior i també s'havia descrit [87]. Per aquesta raó, en primer lloc vam analitzar els efectes de shMath6 sobre l'activació de la cascada transcripcional endocrina a les cèl·lules mPAC promoguda per Neurog3. El silenciament de Math6 afecta la inducció de dos gens específics de cèl·lula β , *IAPP* i *Gck*, els quals codifiquen per l'amilina i la glucocinasa respectivament. En canvi, cap dels factors de transcripció de diferenciació endocrina dianes conegudes de Neurog3 com *NeuroD1*, *Nkx2.2* o *Pax4* semblen estar afectats pel silenciament gènic de Math6 (fig.47 C).

A més a més, també ens vam fixar en els gens especialment bloquejats per l'expressió ectòpica de Math6 com *Slc38a5*, *Pcsk1*, etc. (taula 7) i el shMath6 no té efectes significatius sobre aquest conjunt de gens (dades no mostrades), fet que exclou el paper essencial de Math6 en la resposta d'aquests gens per Neurog3.

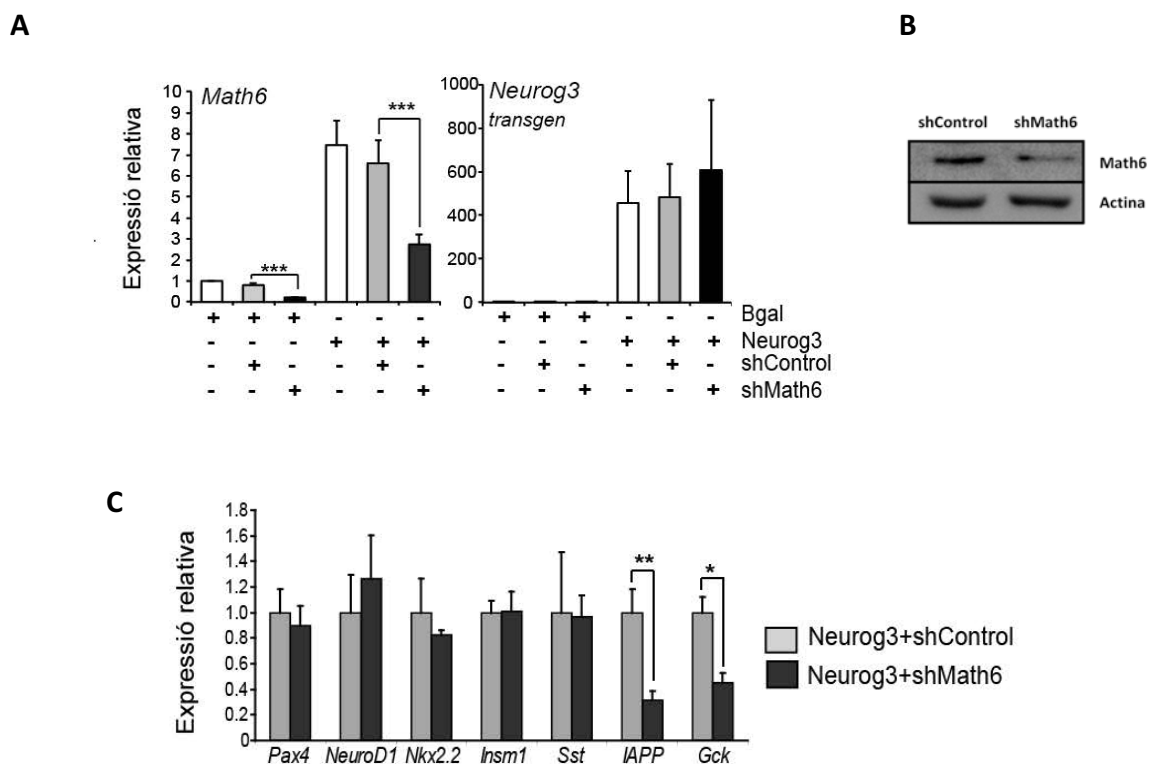


Figura 47. A) Els nivells de mRNAs de *Math6* i del transgen de *Neurog3* es van mesurar per PCR a temps real en cèl·lules mPAC tractades amb els adenovirus indicats i recollides 48h post-transducció. **B)** Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb els adenovirus indicats d'on es van obtenir els extractes proteics totals. Aquests es van separar en un gel 10% SDS-PAGE, transferits en una membrana de nylon i incubats amb un anticòs anti-Math6 (Santa Cruz) i posteriorment amb un anticòs anti-Actina. **C)** Els nivells de mRNA de diferents gens diana *Neurog3* es van quantificar per PCR a temps real 48h després del tractament de les cèl·lules mPAC amb els adenovirus indicats. Els nivells d'expressió de *Neurog3*+shControl se'ls va assignar arbitràriament el valor de 1. Mitjana \pm Sem (N=3-4). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001, test estadístic t-Student.

2.2.2. Microarrays d'expressió

Per obtenir una visió global del programa transcripcional afectat per Math6, vam estudiar els canvis en els perfils d'expressió de les cèl·lules mPAC tractades amb Ad-Neurog3+Ad-shMath6 en comparació amb Ad-Neurog3+Ad-shControl mitjançant *arrays* d'expressió a les 48 h de transducció amb els adenovirus recombinants. Degut a que l'objectiu primordial d'aquest treball és conèixer la funció de Math6 durant el programa de diferenciació endocrina iniciat per Neurog3, és essencial remarcar que aquesta és la principal raó per la qual les dues situacions d'estudi i anàlisi en els *microarrays* són en presència de Neurog3.

En concret, vam identificar un total de 294 gens expressats diferencialment amb un *p valor* ajustat de 0,05 o menys. D'aquests, el 40% aproximadament (121 gens) estan sobre-regulats amb un factor de canvi (FC) de 1,4-3,5, i el 60% (173 gens) disminuïts pel shMath6 amb un factor de canvi de 0,2-0,7 (fig.48 A). A més a més, hem analitzat quins gens són regulats per Neurog3 i a la mateixa vegada pel shMath6. El resultat ens mostren que un 3,1% de les dianes de Neurog3 estan modificades pel shMath6, i que el 32% dels gens diana del shMath6 estan modificats per Neurog3 (94 gens). Cal remarcar que els efectes de Math6 i Neurog3 sobre un mateix *locus* gènic són oposats en el 70% dels casos.

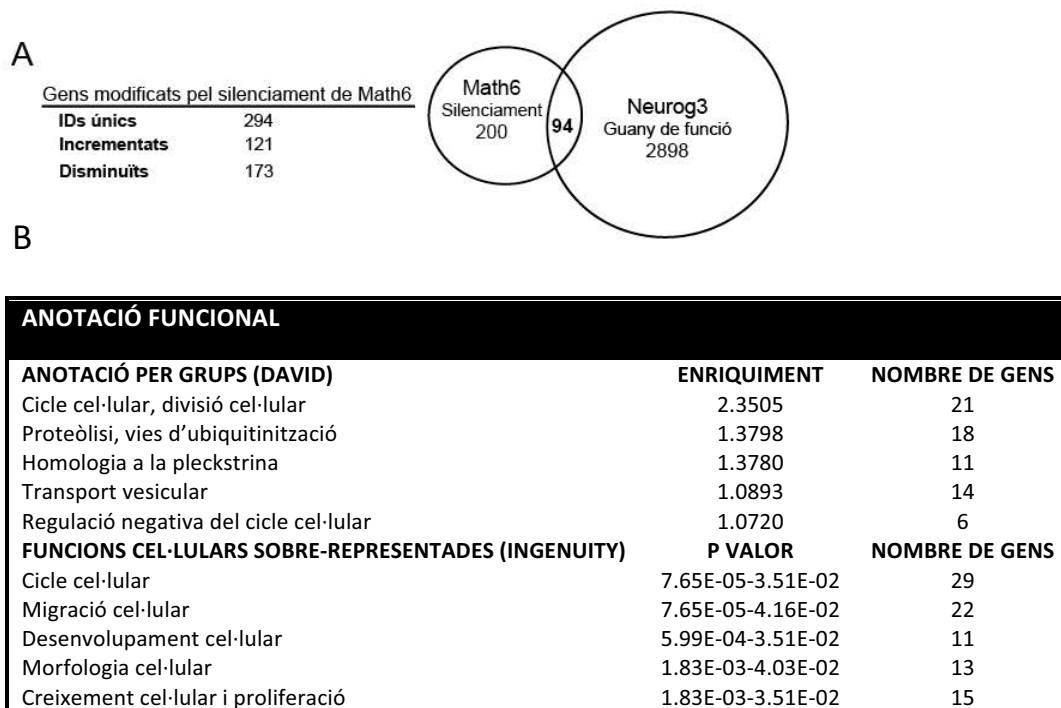


Figura 48. **A)** Nombre de gens i **B)** enriquiment de diferents processos biològics en el grup de gens modificats pel silenciament gènic de Math6.

2.2.3. Classificació funcional dels gens modificats significativament per shMath6

Amb el fi d'identificar possibles categories funcionals entre els gens modificats pel shMath6 vam emprar diferents programes informàtics de gran utilitat en l'anàlisi de *microarrays* per estudiar l'ontologia gènica dels gens modificats. L'anàlisi bioinformàtic amb els softwares Ingenuity i DAVID ens va permetre identificar el **cicle cel·lular** com la funció biològica més sobre-representada entre el grup de gens en estudi (fig.48 B). La taula 9 conté un llistat detallat dels gens modificats de forma significativa pel shMath6 i relacionats amb el cicle cel·lular i la proliferació. Per facilitar la comprensió de les dades, hem classificat els gens en funció del seu paper en progressió del cicle cel·lular, citocinesi, apoptosi i nombrosos factors de transcripció amb funcions reconegudes en la proliferació cel·lular. A més a més, proteïnes involucrades en la proteòlisi via ubiquitinització o SUMOtinització també estan relacionades amb la progressió del cicle cel·lular (per exemple *Ube3a*, *Senp2*) [143, 144]. Però també es van identificar altres processos biològics com la remodelació de cromatina (*Hdac4*, *Sirt7*, *Atxn7l3*) i diverses vies de senyalització (*Wnt9a*, *Jag2*). Molts d'aquests gens han estat validats per PCR a temps real per verificar la certesa dels resultats.

Resumint, aquests resultats demostren que el silenciament gènic de Math6 produeix una important dis-regulació de múltiples gens vinculats amb el cicle cel·lular, fet que indica una funció potencial de Math6 en el control de la proliferació i progressió del cicle cel·lular.

Símbol	Gen	FC
Progressió del cicle cel·lular		
Afap1l2	actin filament associated protein 1-like 2	2,2
Ccng1	Cyclin g1	1,7
Wee1	wee 1 homolog (S, pombe)	1,6
Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	1,5
Plk2	Polo like kinase 2	1,5
Ccnd3	cyclin D3	0,7
Rock2	rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2	0,7
Nek1	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 1	0,6
Cdc6	cell division cycle 6 homolog (S, cerevisiae)	0,6
Cdc20	cell division cycle 20 homolog	0,5
Cdca8	cell division cycle associated 8	0,5
Fancd2	Fanconi anemia, complementation group D2	0,5
Haus4	HAUS augmin-like complex, subunit 4	0,5
E2F7	E2F transcription factor 7	0,5
Ccnb1	Cyclin b1	0,5
Ccnd2	Cyclin d2	0,5
Ccna2	Cyclin a2	0,5
Cdc2a	Cdk1 cyclin-dependent kinase 1	0,5
Plk4	Polo like kinase 4	0,5
Aurka	Aurora kinase A	0,5
Plk1	Polo like kinase 1	0,5
Bub1b	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)	0,4
CenpA	centromere protein A	0,4
Mad2l2	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)	0,4
Aurkb	Aurora kinase B	0,4

Símbol	Gen	FC
Citocinesi		
Incenp	inner centromere protein	0,6
Pttg1	Pituitary tumor transforming gene 1 /securin	0,6
Kif11	kinesin family member 11	0,5
Mastl	microtubule associated serine/threonine kinase-like	0,5
Prc1	Protein regulator of cytokinesis 1	0,5
Anln	anillin	0,4
Kif22	kinesin family member 22	0,4
Cep55	centrosomal protein 55	0,3
Kif23	kinesin family member 23	0,3
Factors de transcripció relacionats amb la proliferació cel·lular		
Mitf	microphthalmia-associated transcription factor	2,2
Creml	cAMP responsive element modulator	2,0
Notch1	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	1,6
Tcf7l2	transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box	0,6
Catabolisme		
Rnf181	ring finger protein 181	2,5
Ube2m	ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast)	2,4
Ubc1	ubiquitin associated domain containing 1	1,7
Fbxo33	F-box protein 33	1,6
Senp2	SUMO/sentrin specific peptidase 2	0,6
Ube3a	Ubiquitin protein ligase E3A	0,6
Nedd4	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4	0,6
Ube2t	ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)	0,5
Apoptosi		
Tp53inp1	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	2,8
Mdm4	transformed mouse 3T3 cell double minute 4	1,6
Birc3	baculoviral IAP repeat-containing 3	0,6
Altres		
Grk5	G protein-coupled receptor kinase 5	2,4
Pdrg1	p53 and DNA damage regulated 1	1,7
Sirt7	sirtuin 7 (silent mating type information regulation 2, homolog) 7 (S, cerevisiae)	1,5
Tcp1	t-complex protein 1	0,6
Sesn1	Sestrin-1	0,5
Pcgf3	polycomb group ring finger 3	0,3
Setd7	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7	0,3

Taula 9. Gens involucrats en la regulació del cicle cel·lular modificats de forma significativa pel silenciament gènic de Math6 (FC=Factor de canvi) Neurog3+shControl vs Neurog3+shMath6.

3. MATH6 I EL CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR

L'estudi a escala genòmica dels efectes del silenciament gènic de Math6 sobre el perfil d'expressió de les cèl·lules ductals mPAC/Neurog3 va revelar el cicle cel·lular com a principal funció potencialment regulada per aquest factor. Els experiments descrits a continuació estan destinats a avaluar els efectes funcionals del shMath6 sobre la progressió de cicle i la proliferació cel·lular a les cèl·lules mPAC.

3.1. Math6 i la proliferació cel·lular

En primer lloc vam estudiar l'efecte de silenciar Math6 sobre les corbes de creixement de la línia cel·lular mPAC. Vam observar que el Ad-shMath6 disminueix de manera significativa el nombre de cèl·lules ja a les 24h i de forma més important a les 48h, tant en absència com en presència de Neurog3. L'expressió d'Ad-Neurog3 per si sol també té un efecte negatiu, tot i que més discret sobre el creixement de les cèl·lules mPAC, fet que corroboraria publicacions recents que mostren Neurog3 com a promotor de la sortida de cicle en progenitors endocrins [130] (fig.49 A).

Per corroborar que la disminució del creixement cel·lular en presència de shMath6 era deguda a una menor proliferació cel·lular, vam analitzar els efectes del shMath6 sobre la síntesi de DNA mitjançant l'anàlisi de la incorporació de BrdU. Tal com es mostra a la figura 49 B, l'Ad-shMath6 disminueix de forma significativa la incorporació de BrdU tant quan es co-infecta amb un adenovirus control com amb Ad-Neurog3. Aquest últim també té un efecte inhibidor significatiu sobre la incorporació de BrdU. És la doble infecció amb Ad-Neurog3 i Ad-shMath6 on es veu més disminuïda la capacitat proliferativa de les cèl·lules mPAC.

Finalment, l'anàlisi de l'expressió de la caspasa 3 fraccionada ens indica que no existeix un increment en el ràtio apoptòtic, enfortint que l'efecte inhibidor del shMath6 sobre el creixement cel·lular és degut a canvis en la proliferació més que sobre la mort cel·lular (fig.49 C).

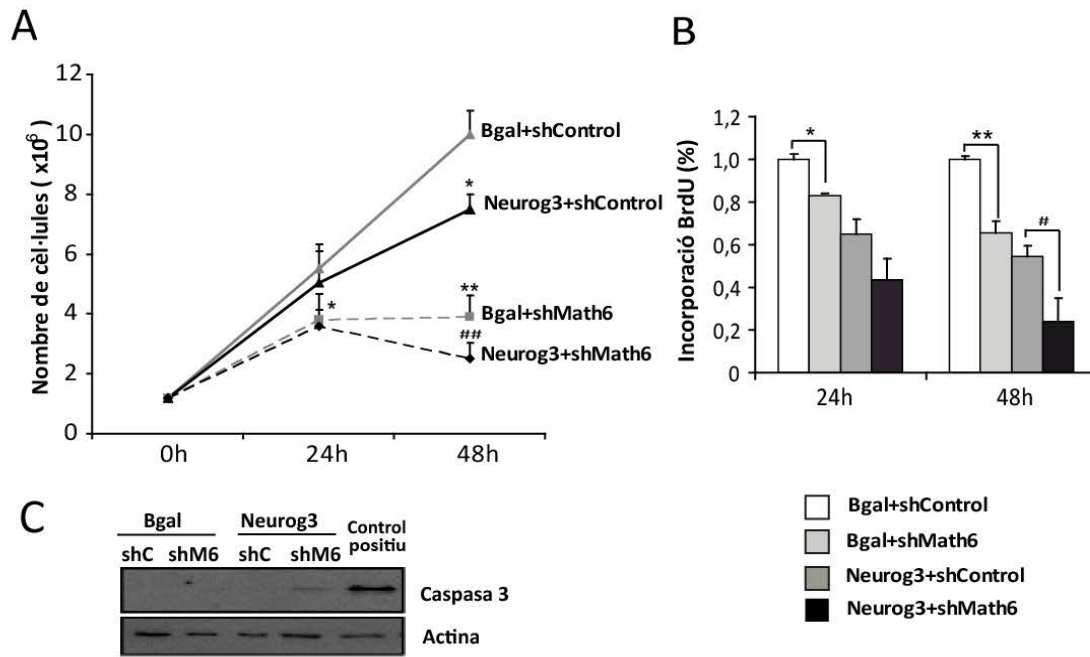


Figura 49. El silenciament gènic de Math6 a les cèl·lules mPAC està associat amb una reducció de la seva proliferació **A)** Les cèl·lules van ser transduïdes amb la dosi corresponent d'adenovirus i després de 24 i 48 hores, les cèl·lules van ser comptades emprant l'aparell Countess® d'Invitrogen (N=4) **B)** Per monitoritzar la síntesi de DNA, es va afegir BrdU al medi de cultiu durant 5h, i es va quantificar la seva incorporació al DNA cel·lular mitjançant ELISA (Roche) (N=3) **C)** La detecció de caspasa 3 fragmentada es va fer amb 50 µg de proteïna mitjançant westernblot. Cèl·lules tractades amb 2mM de thapsigargin van ser emprades com a control positiu d'apoptosi, que mostra com la disminució en la proliferació no és degut a un augment en l'apoptosi. * P < 0,05, ** P < 0,01 vs Bgal+shControl ; # P < 0,05, ## P < 0,01 vs Neurog3+shControl. Mitjana±Sem. Test estadístic t-Student.

3.2. El silenciament de Math6 i la progressió del cycle cel·lular

A continuació vam analitzar la distribució de les cèl·lules mPAC no sincronitzades en les diferents fases del cycle cel·lular mitjançant la tinció amb iodur de propidi i el posterior anàlisi amb citometria de flux. Els estudis es van realitzar a les 24h i 48h post-infecció dels adenovirus indicats. Els resultats eren evidents ja a les 24h (resultats mostrats) obtenint efectes molt similars a les 48h (dades no mostrades). Aquests experiments posen de manifest que les cèl·lules tractades amb el Ad-shMath6 s'acumulen en les fases G2/M (+70%). Aquest augment va acompanyat de la disminució proporcional de cèl·lules en les altres fases de cycle. Aquest cúmul probablement es dona en la transició de G2 a M, degut a que la proporció de cèl·lules fosfo-histona3 positives en el residu Ser10, un marcador de mitosi, està disminuïda en les cèl·lules tractades amb el Ad-shMath6, indicant que el silenciament de Math6 podria afectar la progressió del cycle de la fase G2 a M (fig.50). Una altra vegada, aquests efectes ocorren tant en presència com en absència de Neurog3.

Per altra banda, cal destacar que l'expressió de Neurog3 produeix un augment moderat de la població de cèl·lules en G0/G1, observació que de nou segueix la línia dels efectes observats en altres estudis [130], on es precisa que Neurog3 és responsable de la sortida de cicle abans de l'inici del programa de diferenciació endocrina. Quan comparem Bgal+shControl amb Neurog3+shControl observem un augment del 10% gairebé significatiu ($p=0,061$), mentre que quan comparem les condicions Bgal+shMath6 amb Neurog3+shMath6 observem un augment del 19% ja significatiu ($p = 0,01$). A més a més, aquest increment de cèl·lules en G0/G1 en resposta a l'expressió ectòpica de Neurog3, està recolzat pel resultat obtingut amb el BrdU i els de creixement cel·lular (fig.49) tal com hem comentat anteriorment.

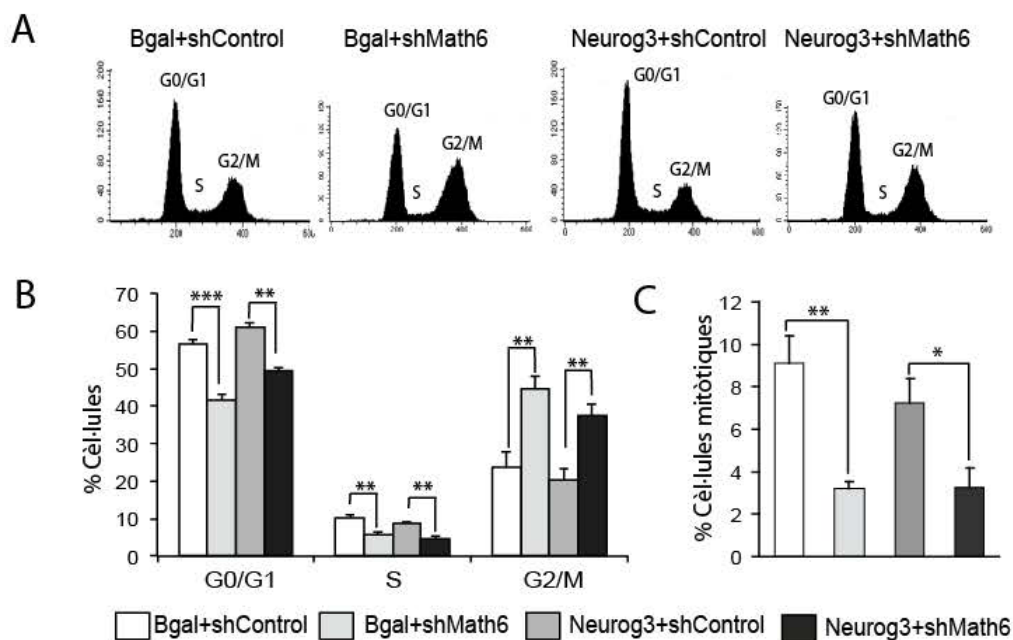


Figura 50. Les cèl·lules mPAC es van analitzar per citometria de flux 24h post-infecció amb els adenovirus indicats a la figura. **A)** Diagrama representatiu dels resultats obtinguts al FACS. **B)** Quantificació de les dades obtingudes amb el FACS. **C)** Tinció de fosfo-histona3 (Ser10) i posterior anàlisi mitjançant citometria de flux. Mitjana±Sem (N=3-4). *P < 0,05; **P < 0,01, ***P < 0,01 vs Bgal+shControl o Neurog3+shControl tal com s'indica. Test estadístic t-Student.

3.3. Efectes de shMath6 sobre el complex CiclinaB1/Cdk1, regulador clau de la transició G2/M

La ciclinaB1 (Ccnb1) és una ciclina mitòtica que s'uneix a la cinasa depenent de ciclina Cdk1. La quantitat de Ccnb1 i l'activitat del complex Ccnb1/Cdk1 augmenta al llarg del cicle cel·lular fins la mitosi, on es redueixen abruptament degut a la degradació que sofreixen (fig.51). El complex Ccnb1/Cdk1 està present a partir de la fase S, però està inhibït per les cinases Wee1 i Myt1, que el fosforilen. Al final de la G2 la fosfatasa Cdc25 s'activa i des-fosforila Cdk1, activant el complex

Ccnb1/Cdk1 que fosforilarà varies proteïnes durant la mitosi (làmina nuclear, condensines, proteïnes fus mitòtic, complex APC). La degradació de la Ccnb1 serà necessària per a que les cèl·lules puguin sortir de la mitosi amb èxit.

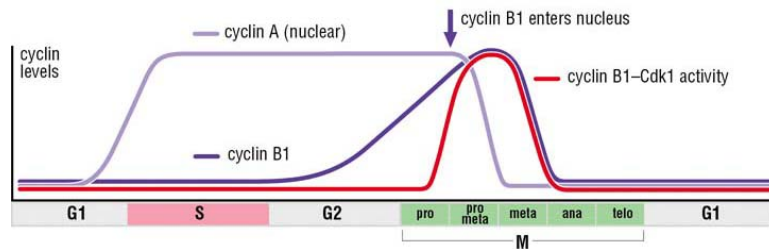


Figura 51. Dinàmica complex Ccnb1/Cdk1 (New Science Press ©)

Degut al paper essencial del complex Ccnb1/Cdk1 en la transició de la fase G2 a M, vam estudiar si l'acumulació de cèl·lules en G2/M ocasionada pel silenciament de Math6 era degut a una disregulació d'aquest complex clau. Primerament vam estudiar l'expressió d'aquests dos factors a nivell proteic a 24h i 48h post-infecció i vam observar que el silenciament de Math6 provocava un augment de l'expressió de Ccnb1 i una disminució de Cdk1, tots dos significatius (fig.52). Els efectes ja eren evidents a les 24h (resultats mostrats) i es mantenien a les 48h (no mostrats).

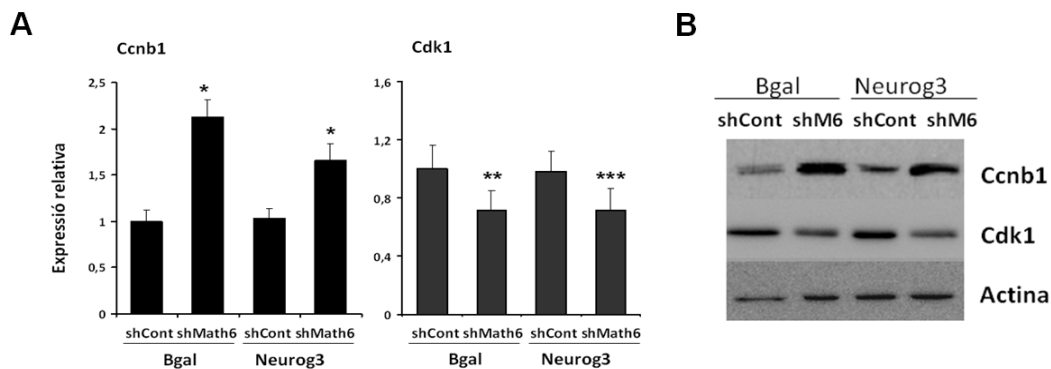


Figura 52. A) Quantificació dels nivells proteics de Ccnb1 i Cdk1 a les cèl·lules mPAC 24h post-infecció amb els adenovirus indicats **B)** Imatge d'una membrana representativa de la detecció proteica. *P < 0,05; **P < 0,01, ***P < 0,01 vs Bgal+shControl. Test estadístic t-Student. Mitjana±Sem. (N=3)

Els resultats anteriors mostren un augment de la quantitat de Ccnb1 a les cèl·lules tractades amb el shMath6, fet que indica que l'acumulació de cèl·lules en les fases G2/M del cicle no estaria relacionada amb una expressió deficient d'aquesta ciclina. No obstant, per a que el complex Ccnb1/Cdk1 sigui funcional cal la seva translocació al nucli que en situacions normals es dona durant la profase mitòtica. A continuació, vam voler analitzar la distribució subcel·lular de Cdk1 i Ccnb1 en

resposta al silenciament gènic de *Math6*. Amb els assajos pertinents emprant les cèl·lules mPAC a les 24h post-infecció, vam observar que mentre que *Cdk1* es troba majoritàriament a la fracció citoplasmàtica, *Ccnb1* es troba majoritàriament en el nucli en totes les condicions estudiades (fig.53). No obstant, vam observar una reducció sensible dels nivells de *Cdk1* i *Ccnb1* en la fracció nuclear en cèl·lules tractades amb Ad-Bgal+sh*Math6* en comparació a les cèl·lules tractades amb Ad-Bgal+shControl. Sembla que hi ha certa retenció del complex *Ccnb1/Cdk1* al citoplasma tot i que la majoria de *Ccnb1* es troba al nucli. Els canvis no són significatius i per tant no semblen ser el mecanisme principal dels canvis observats en el cicle cel·lular.

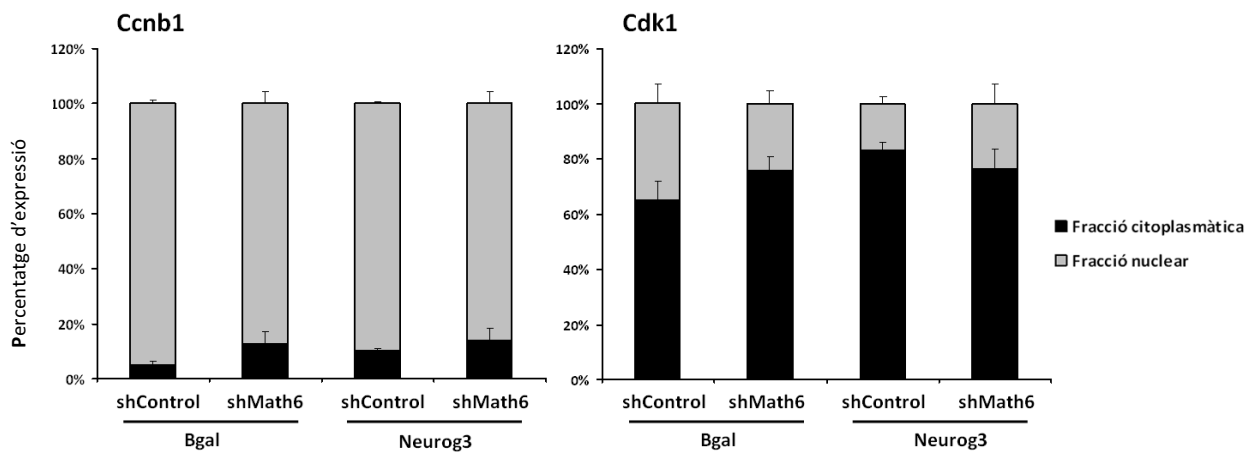


Figura 53. Quantificació dels nivells citoplasmàtics i nuclears de *cdk1* i *ccnb1* en les cèl·lules mPAC 24h post-infecció amb els adenovirus indicats. Representació del percentatge respecte la quantitat total. Mitjana±Sem. (N=3).

Finalment vam estudiar si els efectes del sh*Math6* sobre els nivells proteics de *Ccnb1* i *Cdk1* eren conseqüència de canvis en l'expressió gènica, doncs recordem que *Math6* és un factor de transcripció. Vam determinar l'expressió del mRNA d'aquestes dos proteïnes a les 24h i 48h post-infecció amb els diferents adenovirus, i la figura 54 mostra com no s'observen canvis significatius fins les 48h, quan hi ha una reducció del mRNA tant de *Ccnb1* com *Cdk1* en les cèl·lules tractades amb sh*Math6*, independentment de la presència de Neurog3. De fet, aquests resultats estan d'acord amb els *microarrays* on els dos gens ja van ser identificats com a dianes del sh*Math6*. És sorprenent que el mRNA de *Ccnb1* es comporta de manera oposada a l'expressió proteica, però aquest tipus d'efecte compensatori per aquesta proteïna ja ha estat descrit amb anterioritat [145, 146].

Aquestes dades mostren que el sh*Math6* afecta l'expressió dels gens de la *Ccnb1* i *Cdk1*. No obstant, el fet que 1) la regulació dels mRNAs no es fa palesa fins a les 48h mentre que la proteïna ja mostra canvis a les 24h i, 2) els canvis en proliferació i acumulació de cèl·lules en les fases G2/M del cicle ja

són evident a les 24h, indiquen que la regulació de Math6 sobre la progressió de cicle no estaria mediada directament pels seus efectes sobre l'expressió gènica d'aquests dos factors.

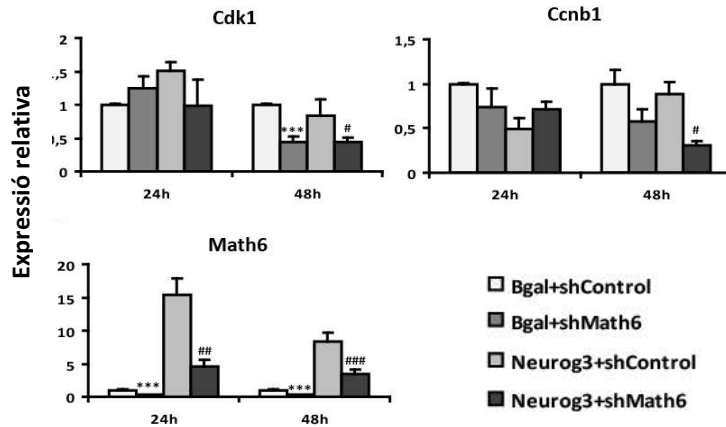


Figura 54. Nivells de mRNA del complex Ccnb1/Cdk1 a 24h i 48h post-infecció en les cèl·lules mPAC mesurats per PCR a temps real. L'expressió es va normalitzar emprant l'expressió de Tbp, i les dades s'expressen en relació a la condició Bgal+shControl normalitzat a 1. Math6 emprat com a control per veure el seu correcte silenciament. Test estadístic t-Student. Mitjana±Sem. (N=3). ***P < 0,001 vs Bgal+shControl; # P < 0,05; ## P < 0,01; #### P < 0,001 vs Neurog3+shControl.

3.4. Canvis d'expressió de gens reguladors del complex Ccnb1/Cdk1 i de la transició G2/M

La pregunta clau que roman sense resposta és quins són els mecanismes moleculars que provoquen la disregulació del complex Ccnb1/Cdk1 a les mPAC en resposta al silenciament gènec de Math6. Nombrosos gens involucrats en la transició G2/M es troben dintre del grup de gens modulats pel shMath6 en els estudis de *microarrays* d'expressió presentats anteriorment, concretament: *Mad2l2*, *Cdc20*, *Bub1b*, *E2f7*, *Cdkn1a* (p21) i *SetD7*. La figura 55 ens mostra l'expressió relativa a nivell de mRNA d'aquests reguladors a les 24h i 48h post-infecció, que ens va permetre discernir entre esdeveniments primerencs i tardans al silenciament de Math6. Amb aquests estudis hem vist com l'expressió de *Mad2l2* i *Bub1b* està inhibida ja a les 24h, mentre que l'expressió d'altres reguladors com *Cdkn1a* (p21) i *Cdc20* no és veu modificada fins les 48h. Tant *Mad2l2* com *Bub1b* estan relacionats amb la regulació negativa del complex APC/C (complex promotor de l'anafase/ciclosoma) el qual és una E3 ubiquitin-lligasa encarregada de degradar ciclins mitòtiques i així promoure la sortida de mitosis i la citocinesis. És sorprenent que la reducció de l'expressió d'aquests inhibidors pugui comportar un augment de la *Ccnb1*, quan un esperaria justament el contrari. A més a més, també observem canvis en altres reguladors del cicle menys caracteritzats com el *SetD7* [147] i *E2F7*. *E2F7* és un inhibidor de la transcripció E2F-dependent capaç de bloquejar la progressió del cicle

cel·lular. És interessant que E2F7 és activat en resposta a Neurog3 a les 48h, i que aquest inducció es troba totalment reprimida per l'absència de Math6.

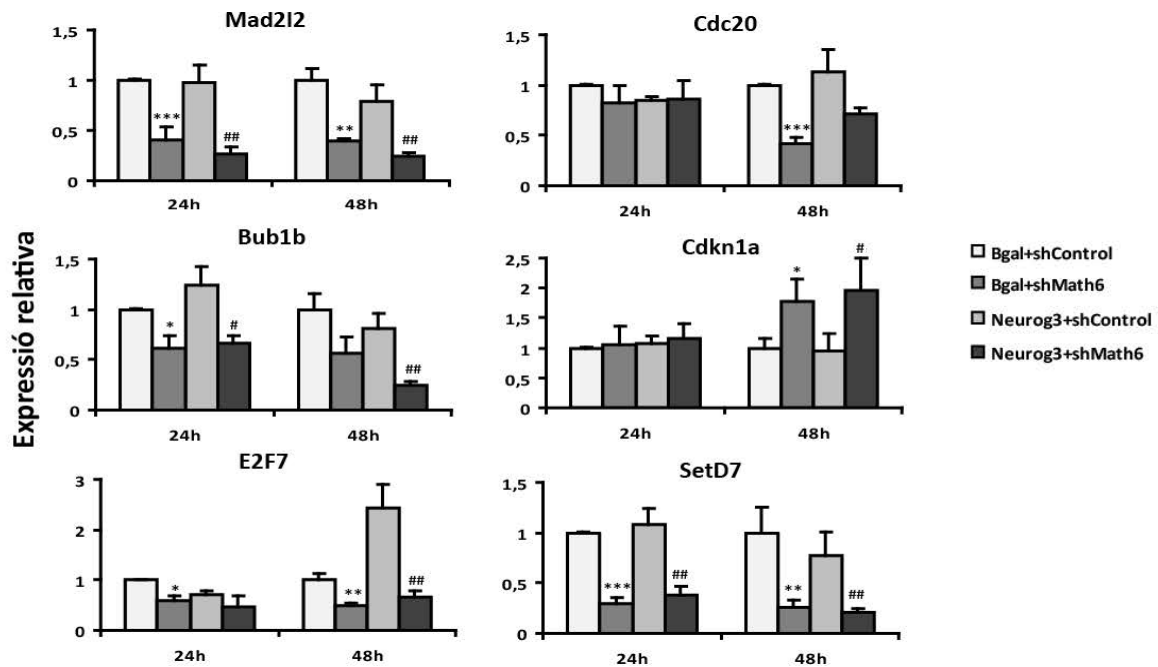


Figura 55. Nivells de mRNA de diferents reguladors del cicle cel·lular mesurat per PCR a temps real a les 24 i 48 hores de la infecció amb els adenovirus corresponents. Expressió normalitzada per l'expressió de Tbp, i les dades s'expressen en relació a la condició Bgal+shControl normalitzat a 1. Mitjana±Sem. (N=3). Test estadístic t-Student. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 vs Bgal+shControl; # P < 0,05; ## P < 0,01 vs Neurog3+shControl.

3.5. Unió de Math6 als promotors de gens de cicle

Degut a que el silenciament gènic de Math6 promou canvis en l'expressió gènica de nombrosos reguladors claus de la transició G2/M, és important determinar si aquests canvis estan ocasionats per un efecte directe o indirecte a la pèrdua de Math6. En altres paraules, si aquests gens són dianes directes de Math6.

A fi de determinar si Math6 s'uneix a regions promotores d'aquests gens, hem realitzat immunoprecipitacions de cromatina en cèl·lules mPAC tractades amb Ad-Math6 i cèl·lules tractades amb l'adenovirus control Ad-Bgal. Math6 està marcat amb una cua myc a l'extrem N-terminal, que ens ha permès utilitzar anticossos anti-myc comercials i validats per aquest tipus de tècnica (l'anticòs anti-math6 disponible no funciona bé). Els gens estudiats han estat els involucrats en la transició de G2 a M (*Mad212*, *Cdkn1a*, *E2F7*, *Cdc20*, *Cdk1*). Com a control negatiu hem emprat el promotor del gen *Actb*.

La figura 56 ens mostra com Math6 no s'uneix al promotor de *Cdk1*, però en canvi si ho fa de forma significativa als promotors de *Mad2l2* i *Cdkn1a*. Per tant la disminució a nivell de mRNA de *Mad2l2* es deu probablement a un efecte directe de Math6 sobre el seu gen, igual que l'augment de *Cdkn1a* tot i que aquest sigui de forma més tardana. No apareixen en la figura els altres gens estudiats i anomenats anteriorment degut a que no hem observat cap tipus d'unió de Math6 sobre els seus promotors.

Per tant, Math6 podria estar afectant directament l'expressió dels gens codificants de *Mad2l2* i *Cdkn1a*. Tal com s'ha comentat abans, *Mad2l2* és un regulador del complex APC/C que forma part del checkpoint mitòtic, que com a principal funció té preveure l'inici de l'anafase fins que els cromosomes estiguin correctament alineats. Per la seva banda, *Cdkn1a* és un pilar fonamental en el control del checkpoint en G2 independent de *cdc25c* [148].

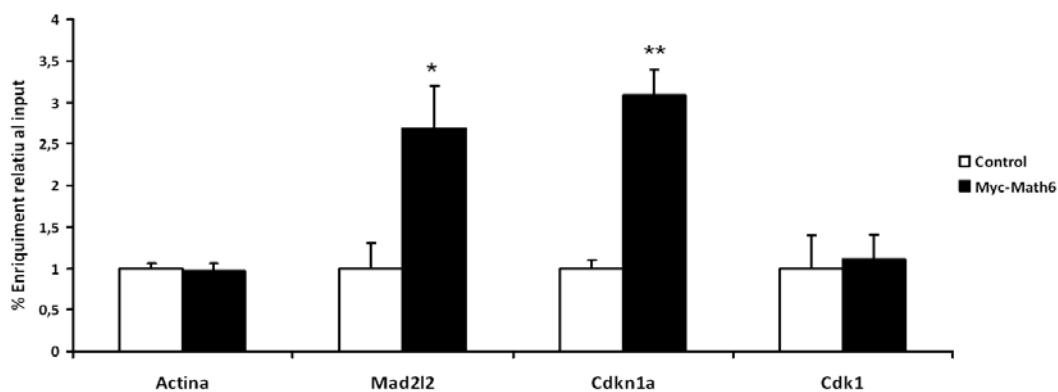


Figura 56. La cromatina es va preparar a partir de les cèl·lules mPAC tractades amb els adenovirus recombinants indicats i la immunoprecipitació es va portar a terme amb un anticòs anti-myc. El DNA associat es va analitzar per PCR a temps real emprant els primers indicats en la taula annexa 1. El percentatge d'enriquiment relatiu al input va ser calculat com es descriu a materials i mètodes, i expressat relatiu a les cèl·lules tractades amb l'adenovirus control (normalitzat a 1). (N=2-4). Mitjana±Sem. *P < 0,05; **P < 0,01 vs Control. Test estadístic t-Student.

3.6. Proliferació de les cèl·lules Math6-GFP positives *in vivo*

Els resultats derivats dels *microarrays* i posterior comprovació per estudis *in vitro*, demostren un paper potencial de Math6 en el control de la progressió del cicle cel·lular, un aspecte molt important de la diferenciació però poc entès fins ara. Per aquesta raó, caldria veure en quin estatus de proliferació es troben les cèl·lules que expressen Math6 en el pàncrees embrionari, i això ho hem estudiat mitjançant la co-localització de la proteïna GFP d'un animal heterozigot knockin GFP-Cre en el locus gènic de Math6 prèviament caracteritzat [87] i disponible en el grup, amb el marcador de

proliferació Ki67. L'anàlisi revela que el 18% de les cèl·lules GFP (Math6) positives són també Ki67 positives a dia de desenvolupament e15.5, localitzant-se la majoria de cèl·lules proliferants GFP positives en els acinis (fig.57). Per tant, la majoria de cèl·lules GFP positives no es troben en un estat proliferatiu actiu.

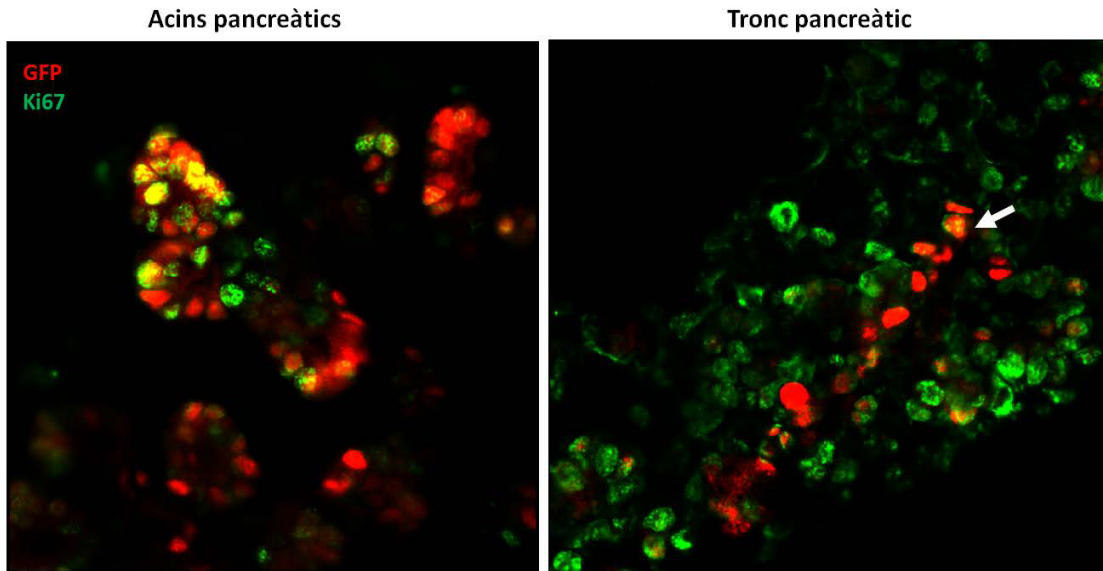


Figura 57. L'estudi de l'estat de proliferació de les cèl·lules Math6(GFP) positives mitjançant el marcador Ki67 a e15.5 ens mostra que la majoria de cèl·lules doble positives es troben en els acins pancreàtics (imatge de l'esquerra) mentre que en el tronc (imatge de la dreta) el nombre de cèl·lules GFP/Ki67 (fletxa blanca) és més reduït. Imatge representativa d'un animal heterozigots Knockin GFP-Cre emprant criotalls, a una magnificació de 40x. Es van comptar un total de 1500 cèl·lules GFP positives.

4. CARACTERITZACIÓ DEL FENOTIP PANCREÀTIC DEL MODEL MURÍ GEN-ANUL·LAT PER MATH6 ESPECÍFIC DE PÀNCREES

A fi de determinar el paper de *Math6* durant el desenvolupament pancreàtic es va generar un model murí per *Math6* específic de pàncrees utilitzant la metodologia Cre/LoxP. Prèviament el grup va generar un ratolí gen-anul·lat no condicional però la letalitat dels animals en estadis molt primerencs del desenvolupament embrionari no va permetre l'estudi del pàncrees en dit model [87].

4.1. Generació i comprovació del model

4.1.1. Ratolins *Math6* fl/fl

En col·laboració amb el Dr. M.German (Diabetes Center, UCSF, EUA) es van generar ratolins portadors dels llocs de recombinació LoxP flanquejant l'exó 1 del gen de *Math6* que codifica per a la major part de la proteïna (257 aminoàcids dels 322 totals, incloent el domini bàsic i la primera hèlix del domini bHLH).

El mètode emprat per l'elaboració d'aquest model animal es basa en la tècnica d'enginyeria cromosòmica anomenada el 2001 com "*Recombineering*" [149] (fig.58). A grans trets, mitjançant aquest mètode s'introdueixen els lloc *loxP* i les marques de selecció positiva i negativa dins d'un plàsmid d'alta còpia per recombinació homòloga que conté prèviament clonat la seqüència que es vol silenciar. Llavors la zona del plàsmid que conté el material d'interès és escindida i transformada al locus gènic corresponent de les cèl·lules mare. Les cèl·lules que hagin introduït la regió d'interès, podran ser seleccionades i es tirarà endavant amb el naixement de ratolins portadors d'aquest al·lel condicional.

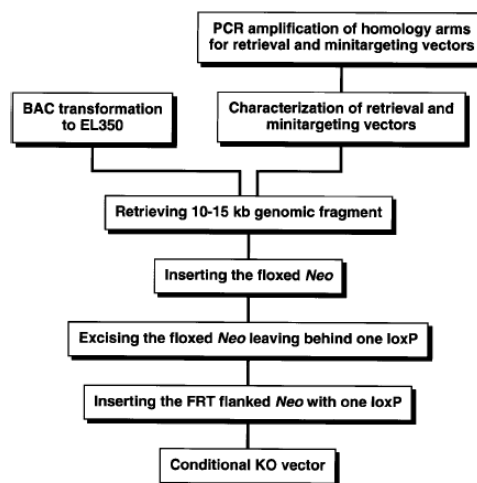


Figura 58. Taula de flux que mostra les diferents passes involucrades en la elaboració d'un vector gen-anul·lat condicional per *recombineering* [149].

4.1.2. Ratolins transgènics Pdx1-Cre

Per tal d'eliminar *Math6* en el pàncrees hem emprat la línia transgènica Pdx1-Cre. En els animals transgènics Pdx1-Cre la recombinasa Cre s'expressa sota el control de 4,3 Kb del promotor del gen de Pdx1. Aquesta línia va ser generada pel laboratori del Dr. D.Melton (Harvard University, EUA) [128] i ha estat àmpliament utilitzada per diversos laboratoris. En els animals Pdx1-Cre, la recombinasa Cre es comença a expressar a l'endoderm pancreàtic al voltant del dia de desenvolupament e10.5 de manera que permet eliminar el gen floxejat (en aquest cas *Math6*) dels tres compartiments pancreàtics, ductal, endocrí i exocrí.

Com a pas inicial, per tal de comprovar l'eficiència de recombinació d'aquesta línia Cre en les nostres mans, vam creuar ratolins mascles Pdx1-Cre amb femelles YFP (R26-stop-eYFP) [150], d'aquesta manera la proteïna fluorescent groga s'expressarà en totes aquelles cèl·lules on hi hagi hagut recombinació. Aquesta senyal es pot veure directament amb una lupa de fluorescència. Vam estudiar l'expressió de la proteïna fluorescent en embrions de e14.5 (fig.59) i en nounats. En ambdós casos, en els animals control no es pot detectar expressió de la proteïna fluorescent mentre que en els animals positius per Pdx1-Cre s'observa fluorescència en el pàncrees tal i com s'esperava, i de forma puntual en el duodè rostral i l'estómac antral, en concordança amb l'expressió del gen de *Pdx1* endògen.

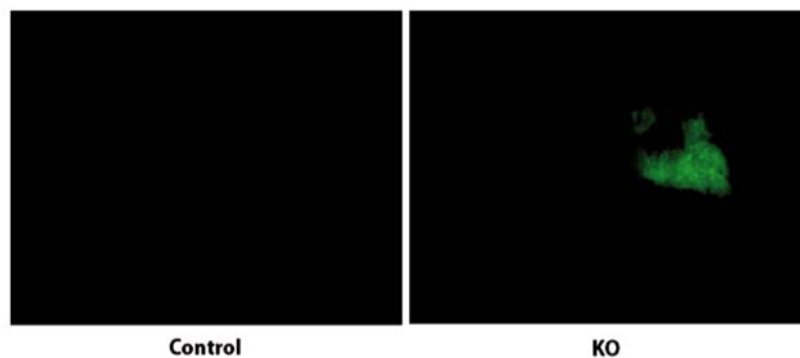


Figura 59. Imatge de l'eficiència de recombinació de la línia Pdx1-Cre recombinasa emprada per generar el nostre model gen-anul·lat específic de pàncrees. Mascles Pdx1-Cre van ser creuats amb femelles YFP i les seves generacions van ser analitzades a e14.5 mitjançant una lupa de fluorescència.

4.1.3. Recombinació

Per generar el model gen-anul·lat de *Math6* específic de pàncrees, la nostra estratègia va ser creuar mascles Pdx1-Cre positius i heterozigots per l'al·lel floxejat de *Math6* (fl/+), amb femelles Pdx1-Cre

negatives i homozigotes per al·lel floxejat de Math6 (fl/fl). D'aquesta manera, a la següent generació (F2) hauríem d'obtenir un 25% de ratolins gen-anul·lats per Math6 (Pdx1+ fl/fl) (als quals anomenem KO), un 25% de ratolins heterozigots per Math6 (Pdx1+ fl/+) (Het), i un 50% restant de ratolins Pdx1-Cre negatius (Pdx1- fl/+ o fl/fl), que seran emprats com a controls en cadascuna de les camades.

Femelles embarçades de la F1 van ser sacrificades per veure si la recombinació s'estava efectuant de forma correcta. Aquest va ser el primer pas per tal de validar el model. Vam disseccionar els primordis pancreàtics dels embrions a dia de desenvolupament e15.5 i vam extreure el DNA genòmic per poder realitzar les PCRs de comprovació. El model emprat ens permet amplificar una banda per PCR quan hi ha recombinació, sinó el fragment a ampliar es massa llarg per a les condicions de PCR escollides. Vam poder veure com la recombinació i escissió de Math6 es produeix únicament en el pàncrees (fig.60).

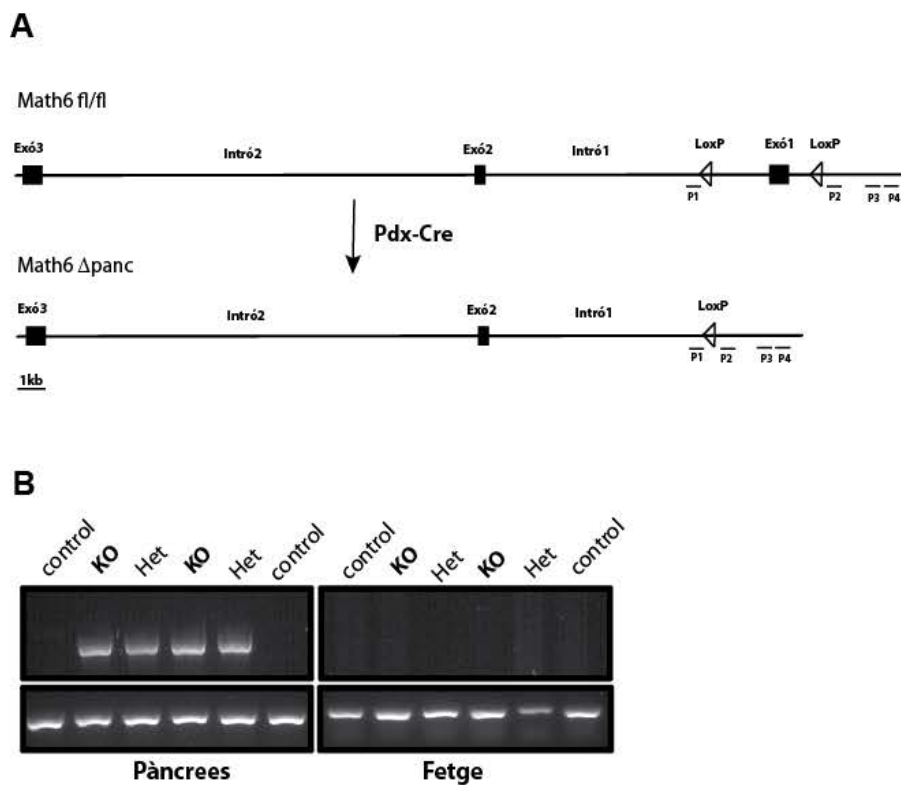


Figura 60. Detecció de l'al·lel floxejat o recombinant del gen de Math6. A) Representació de l'estructura de l'al·lel de Math6. La recombinació mediada per Cre produeix la deleció de l'exó 1 de Math6 que codifica el 80% de la proteïna. **B)** L'amplificació per PCR de la regió al voltant de les regions loxP (encebadors 1-2 mostrats com P1 i P2) ens permet detectar una banda quan la recombinació ha tingut lloc (panell superior). Els encaixadors 3-4 (P3 i P4) serveixen com a control (panell inferior).

4.1.4. Comprovació de la disminució de l'expressió de Math6 a e14.5 i e15.5

A continuació, vam estudiar l'expressió de Math6 a nivell de mRNA en el pàncrees a e14.5 i e15.5. Els estudis d'expressió gènica ens han permès veure una disminució de l'expressió de Math6 del 67% en KO a e14.5 i del 77% per als de e15.5 (fig.61). S'ha de tenir en compte que l'al·lel floxejat no ha recombinat en cèl·lules del pàncrees que no han expressat mai Pdx1, com per exemple les cèl·lules mesenquimals o les endotelials. També cal recordar que l'expressió del Pdx1-Cre té un perfil mosaic [151], no en totes les cèl·lules que s'expressa hi haurà deleció.

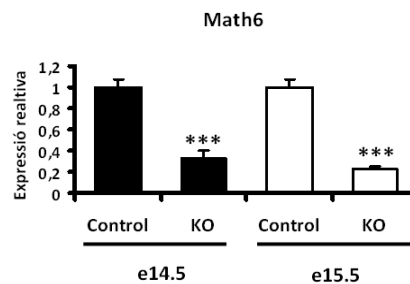


Figura 61. Nivells de deleció de Math6 en el model gen-anul·lat específic de pàncrees a e14.5 i e15.5 a nivell de mRNA. Nivells d'expressió normalitzats per l'expressió de Tbp, les dades s'expressen en relació al control normalitzat a 1. N per animals e14.5 =7; N per animals e15.5 =10. Mitjana±Sem. Test estadístic T-Student. *** P < 0,01 vs control.

4.2. Caracterització dels ratolins KO al naixement (P1)

Un cop comprovada l'eficiència de l'estratègia emprada per eliminar Math6 del pàncrees, vam procedir a estudiar quin impacte tenia aquesta eliminació sobre la formació de l'òrgan. En primer lloc vam comprovar que els ratolins KO neixen i ho fan a la freqüència esperada (24,5% de KO, 27,5% de Het i 48% de controls, N = 32). Com a primer pas, vam analitzar el pàncrees dels animals el dia del seu naixement (P1).

4.2.1. Estudi macroscòpic del pàncrees d'animals P1

Els animals KO naixen amb un pes similar als animals control (fig.62) (**control** $1,5 \pm 0,06$ vs **KO** $1,6 \pm 0,06$ g). En referència a les glicèmies d'aquests dos grups d'animals no hi ha diferències significatives ($46,6 \pm 2,6$ vs $50,8 \pm 3,8$ mg/dL). Els pàncrees dels animals KO tenen un aspecte macroscòpic normal, si bé observem una tendència a que siguin una mica més grans, amb un increment de gairebé el 30% en comparació amb els animals control de la mateixa camada ($7,7 \pm 0,7$ vs $9,9 \pm 0,9$ mg), que es conserva quan normalitzem el pes del pàncrees pel pes corporal de l'animal ($0,51 \pm 0,05$ vs $0,64 \pm 0,07$ u.a).

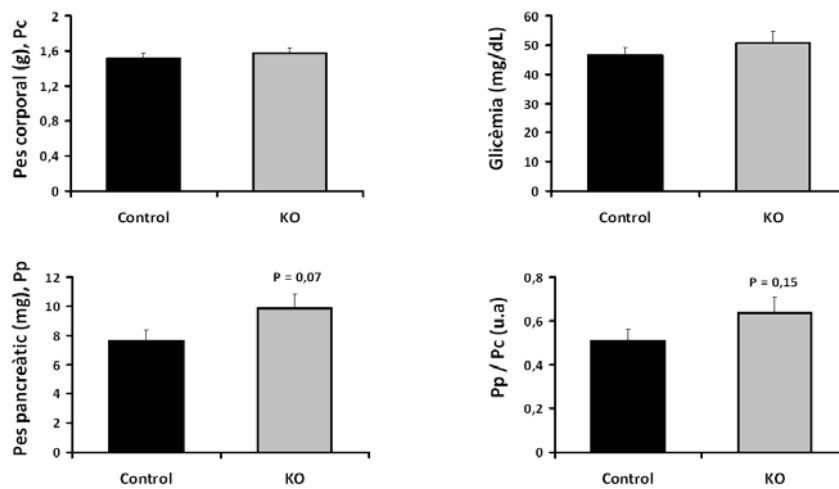


Figura 62. Detecció de canvis macroscòpics en animals P1. Es van analitzar un total de 6 camades amb una N=10 per als controls i N=8 per als KO. Mitjana \pm Sem. Test estadístic t-Student. (u.a = unitats arbitràries).

4.2.2. Anàlisi morfomètrica del pàncrees dels animals P1

Amb la finalitat d'estudiar l'efecte de l'eliminació de Math6 sobre la diferenciació pancreàtica, hem fet una anàlisi morfomètrica detallada utilitzant seccions seriades del teixit pancreàtic fixat. Hem analitzat l'àrea corresponent al compartiment endocrí mitjançant tinció per les hormones insulina, glucagó i somatostatina. En primer lloc, cal destacar que observem tinció per totes aquestes hormones en el pàncrees dels animals KO, fet que indica que Math6 no és essencial per a la formació dels llinatges endocrins majoritaris (fig.63).

Tot i haver mesurat el mateix nombre de talls, els ratolins KO evidencien una major àrea analitzada, corroborant els resultats de pes de l'òrgan mostrats anteriorment (fig.64 A). L'estudi de l'àrea ocupada per les hormones pancreàtiques majoritàries demostra que l'eliminació de Math6 no produeix canvis aparents en l'especificació endocrina versus l'especificació exocrina del pàncrees, doncs el percentatge d'àrea endocrina/àrea total es manté invariable entre animals KO i controls (control $1,59\pm 0,46$ vs KO $1,75\pm 0,47$). Estudiant de forma més específica cadascun dels tres tipus cel·lulars endocrins més abundants, tampoc observem canvis en la proporció dels llinatges endocrins α i β , a excepció d'un augment significatiu del 40% de l'àrea positiva per somatostatina (llinatge δ) en els animals KO respecte als control (fig.64 B). A més a més, hem comprovat que aquest augment de l'àrea fraccional de somatostatina és també evident en animals de 3 setmanes d'edat (control $0,039\pm 0,01$ vs KO $0,086\pm 0,03\%$) (fig.65).

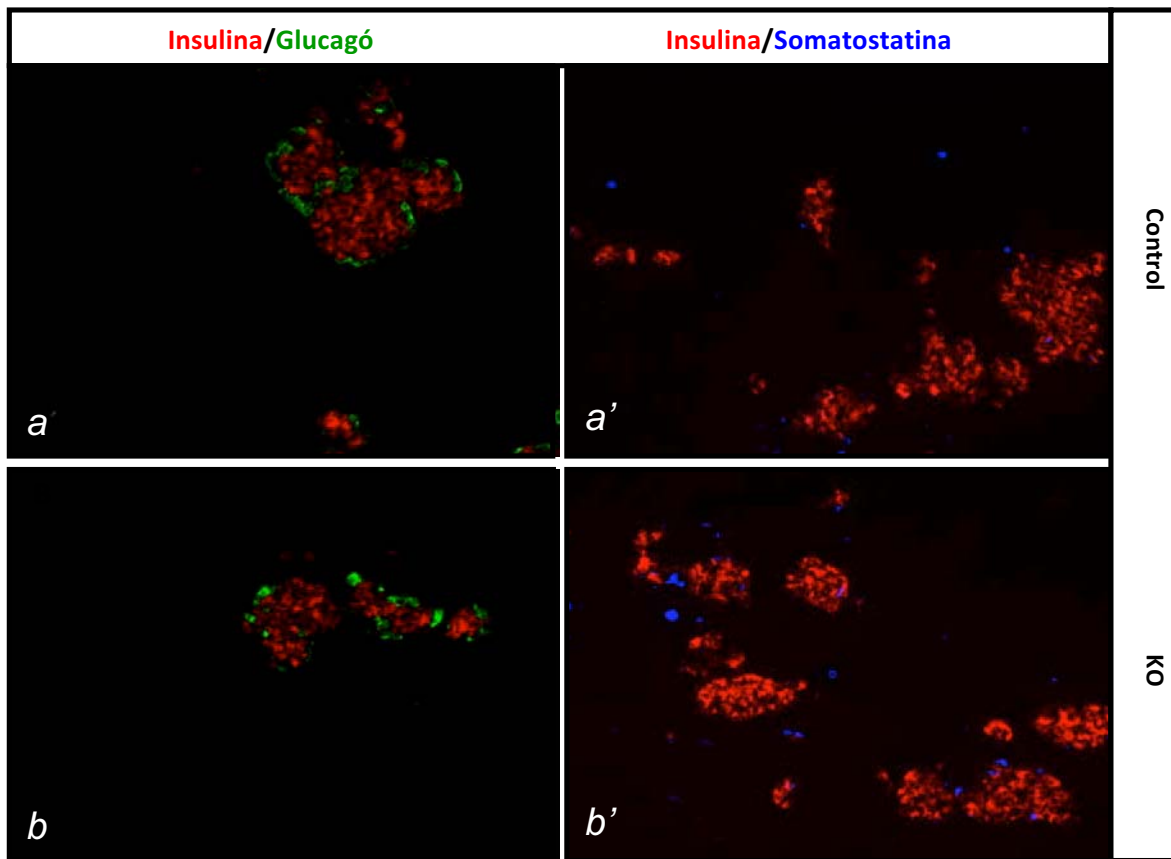


Figura 63. Tinció per les hormones pancreàtiques majoritàries a l'estadi P1 dels animals deficients per *Math6*. El dia 1 de vida hem fet l'extracció del pàncrees dels animals, l'hem fixat i deshidratat i seguidament hem parafinitzat. Hem fet immunofluorescència de les hormones insulina (vermell), glucagó (verd) i somatostatina (blau) en animals deficients per *Math6* al pàncrees i en animals control.

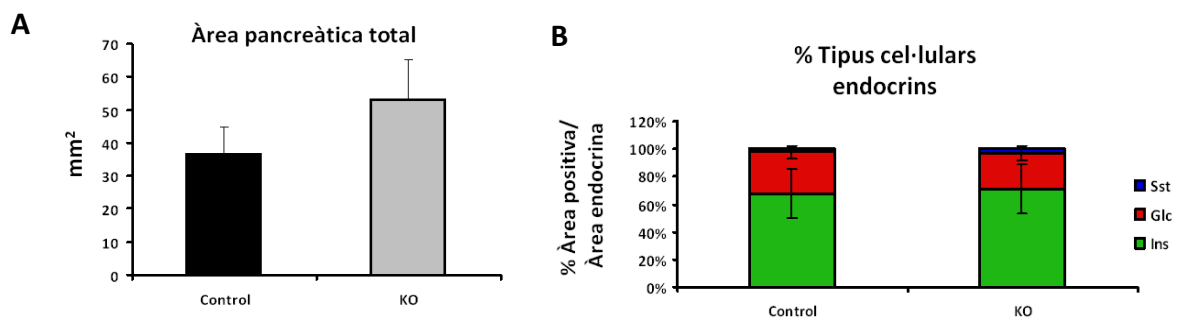


Figura 64. Immunodetecció i determinació de l'àrea endocrina en animals P1. **A)** Àrea total de pàncrees analitzada **B)** Relació d'àrea de cada tipus endocrí en relació a l'àrea endocrina total i taula amb percentatges de cada tipus cel·lular respecte àrea total que mostra un increment específic de l'àrea somatostatina positiva. Es van analitzar un total de 3 animals per grup. Mitjana±Sem. Test estadístic t-Student. * P < 0,05 vs control.

	Control	KO
Àrea pancreàtica (mm ²)	36,4 ± 9,1	48,9 ± 10,4 (p=0,33)
Insulina (% de l'àrea total)	1,15 ± 0,29	1,29 ± 0,32
Glucagó (% de l'àrea total)	0,5 ± 0,07	0,46 ± 0,096
Somatostatina (% de l'àrea total)	0,04 ± 0,003	0,057 ± 0,002 *(p=0,013)

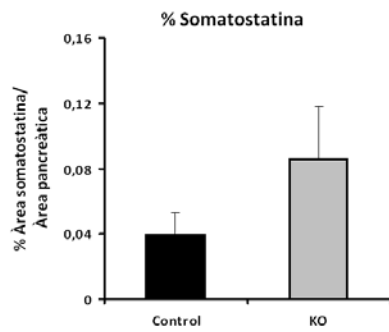


Figura 65. Immunodetecció i anàlisi de l'expressió de l'àrea somatostatina positiva en animals de tres setmanes d'edat. Es van analitzar un total de 2 animals per grup. Mitjana \pm Sem.

4.3. Caracterització dels animals KO en l'adultesa

Els resultats obtinguts fins ara mostren que l'absència de Math6 durant el desenvolupament no té un efecte dramàtic sobre l'especificació i formació de les cèl·lules endocrino-pancreàtiques. No obstant, no es poden descartar efectes menys evidents durant el programa de diferenciació o en el manteniment d'aquest que puguin acabar afectant la funció d'aquestes cèl·lules, que en el cas que hi siguin, podrien no fer-se evident fins a l'adultesa.

4.3.1. Homeòstasi de la glucosa (IPGTT)

Per tal de determinar possibles defectes en la funció endocrino-pancreàtica com a conseqüència de l'eliminació de Math6 al pàncrees, hem estudiat el metabolisme de la glucosa mitjançant tests IPGTT (test intraperitoneal de tolerància a la glucosa) en animals mascles adults a 10, 24 i 36 setmanes de vida.

No hi ha diferències significatives en l'evolució del pes corporal entre animals control i KO des de les 10 a les 36 setmanes de vida, tot i que a les 36 setmanes els KO mostren una tendència a un menor pes corporal ($p=0,09$) (fig.66). Tampoc observem diferències significatives en les glicèmies basals després de 6h de dejuni a les 10 i 24 setmanes, però sí que observem una disminució significativa de la glicèmia basal en els animals KO de 36 setmanes respecte el grup control.

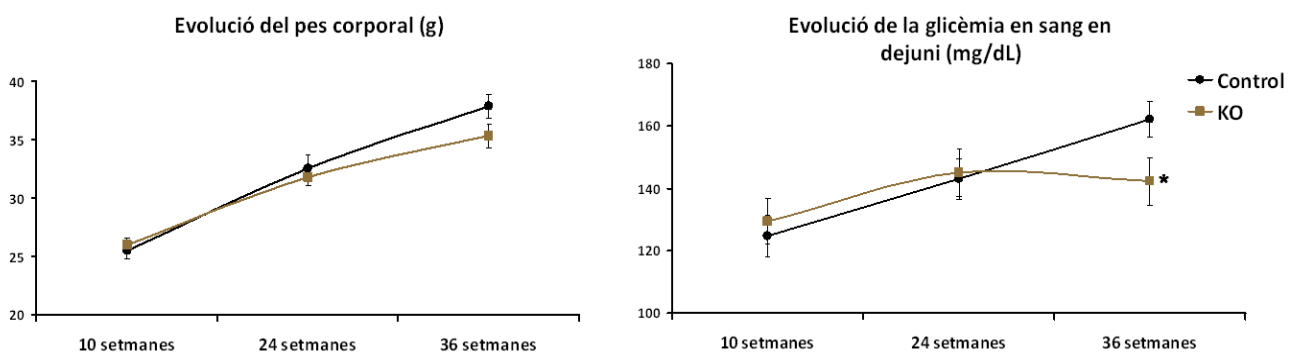


Figura 66. Evolució del pes i glicèmia inicial al llarg de les setmanes d'estudi. Mitjana \pm Sem. Test estadístic t-Student. * $P < 0,05$ vs control.

Pel que fa a les corbes de glicèmia dels tests IPGTT, no s'observen diferències entre controls i KO en cap de les edats estudiades (fig.67).

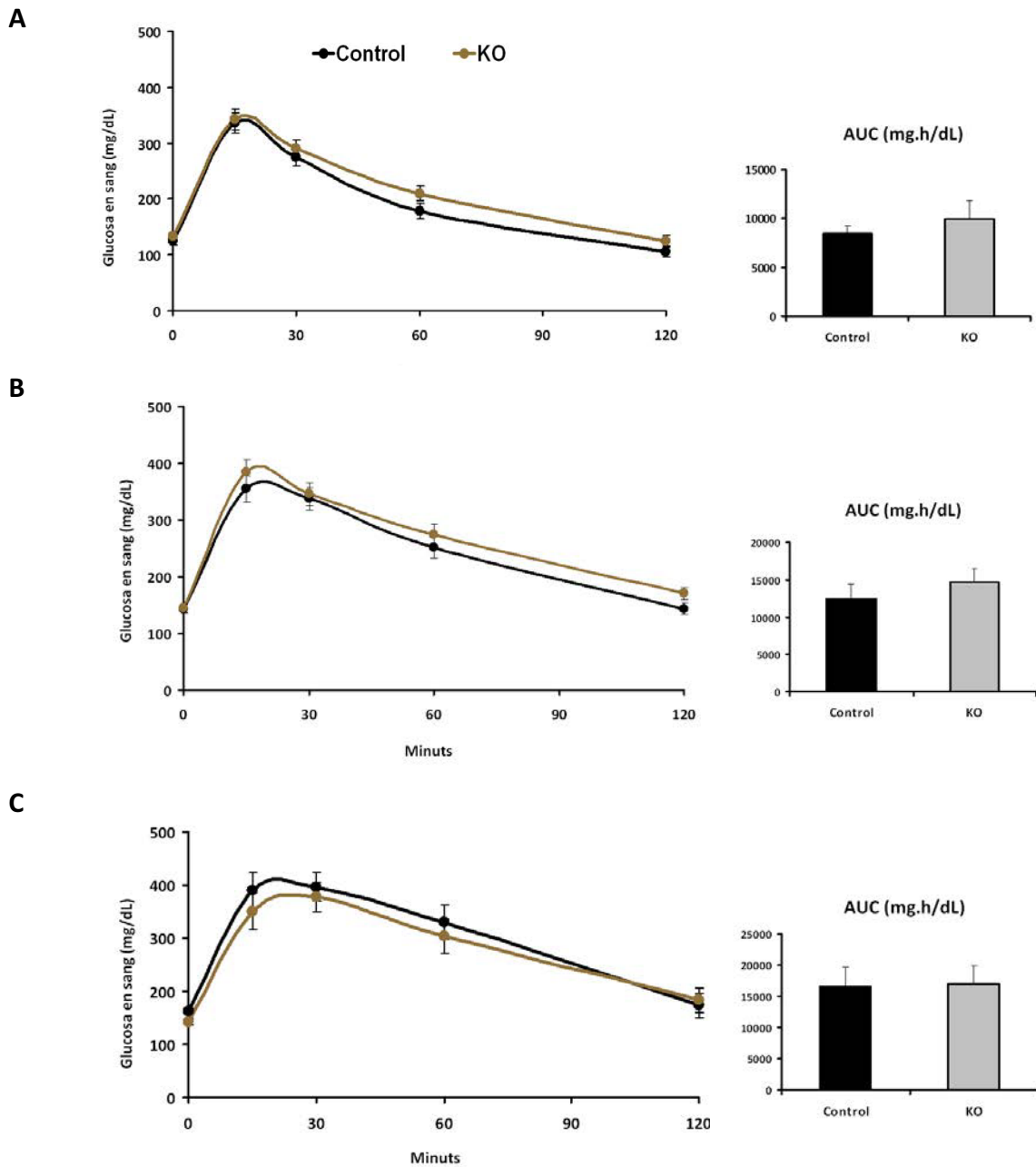


Figura 67. Test de tolerància a la glucosa en animals adults gen-anul·lats mascles per Math6 i salvatges. Corbes de glicèmia del test intraperitoneal a la glucosa (IPGTT) i càlcul de l'àrea sota la corba (AUC) mitjançant la regla del trapezoide a les **A)** 10 setmanes d'edat **B)** 24 setmanes i **C)** 36 setmanes. N 10 setmanes 14 controls vs 10 KO; N 24 setmanes 12 controls vs 13 KO; N 36 setmanes 12 controls vs 14 KO. Mitjana \pm Sem.

Una observació interessant és el fet que mentre els animals control es tornen intolerants a la glucosa amb l'edat, aquest empitjorament de la tolerància sembla estar reduït en els animals KO, en

particular entre les setmanes 24 i 36 de vida. Malauradament no disposem encara de dades d'animals més grans que ens permetin corroborar aquestes dades (fig.68).

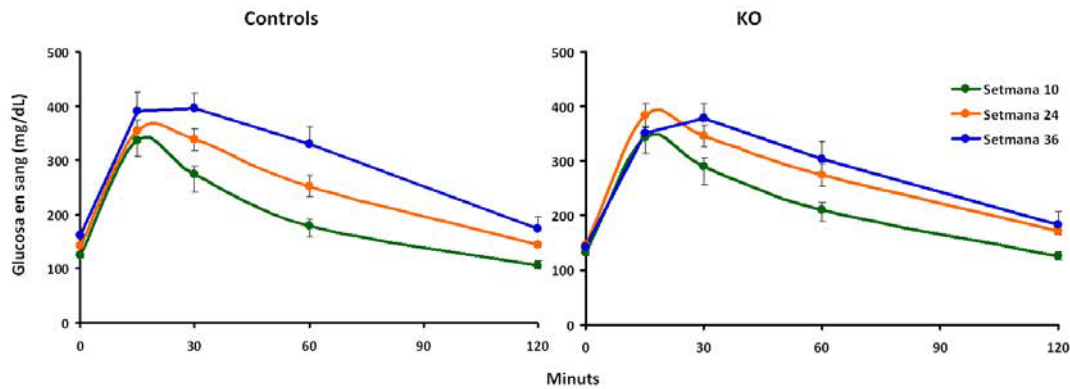


Figura 68. Comprovació de les glicèmies dels tests de tolerància a la glucosa en animals adults gen-anul·lats mascles per Math6 i salvatges a les 3 edats indicades. . N 10 setmanes 14 controls vs 10 KO; N 24 setmanes 12 controls vs 13 KO; N 36 setmanes 12 controls vs 14 KO. Mitjana±Sem.

Finalment vam determinar la insulinenèmia en plasma dels animals de 36 setmanes, els quals presentaven una disminució significativa de glicèmia en dejuni, i vam observar que els plasmes d'aquests animals KO contenen una menor concentració d'insulina que els animals control (fig.69).

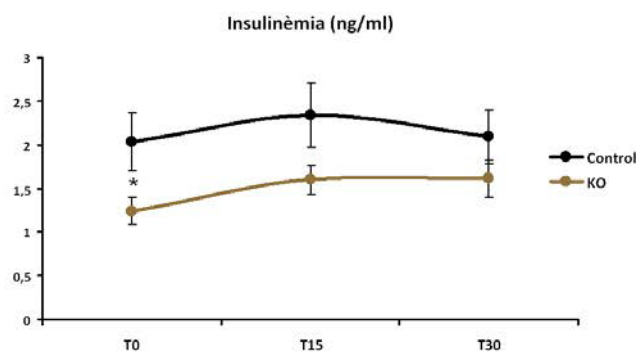
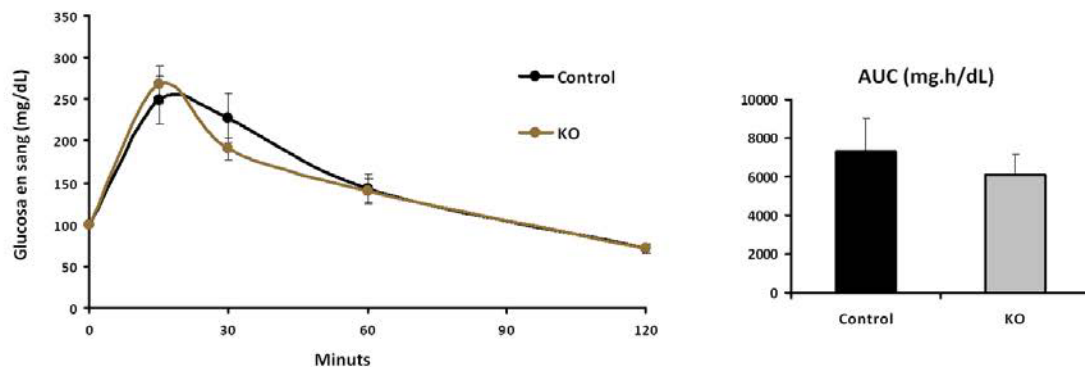


Figura 69. Insulinenèmia de plasmes d'animals mascles de 36 setmanes. Es van emprar els plasmes recollits durant la IPGTT a temps 0, abans d'injectar la càrrega de glucosa, 15 i 30 minuts després d'aquesta injecció per estudiar la concentració d'insulina que contenien. N=12; Mitjana ± Sem. Test estadístic t-Student. * P < 0,05 vs control.

Després vam voler veure si les diferències observades en les glicèmies dels animals de 36 setmanes també es veia en femelles de la mateixa edat, ja que és la primera caracterització d'aquest model animal i no tenim cap tipus de dades prèvies. Els resultats de la figura 70 ens mostra que tampoc existeixen canvis en les glicèmies derivades del test de tolerància a la glucosa, únicament una

tendència a una menor glicèmia basal (control $122 \pm 5,07$ vs KO $111 \pm 6,14$ mg/dL) tal hi com s'observa amb els mascles.

A



B

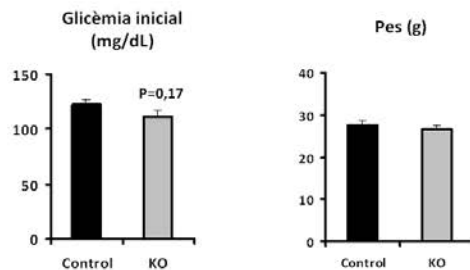


Figura 70. Pes corporal, nivells basals de glucosa i test de tolerància a la glucosa en animals adults gen-anul·lats per Math6 femelles i salvatges a 36 setmanes d'edat **A)** Corbes de glicèmia del test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (IPGTT) i representació de l'àrea sota la corba (AUC) per cadascun dels grups d'estudi calculada emprant la regla del trapezoide. **B)** Valors de glicèmia basal i pes corporal. N= 10 controls vs 9 KO. Mitjana \pm Sem. Test estadístic t-Student.

En conjunt, aquests estudis indiquen que l'absència de Math6 en el pàncrees no comporta alteracions greus en el control de l'homeòstasi de la glucosa en animals adults. En el futur, seria interessant avaluar si la disminució de glicèmia i insulinenèmia observada en animals KO de 36 setmanes es veu accentuada amb l'envelliment o quan els animals han d'afrontar condicions fisiopatològiques adverses com podria ser l'obesitat.

4.3.2. Estudi macroscòpic del pàncrees dels animals KO de 36 setmanes

En la figura 71 A observem com no hi ha diferències en quant al pes del pàncrees (**control** $1,06 \pm 0,13$ vs **KO** $0,96 \pm 0,07$ g), que es mantenen quan el normalitzem pel pes corporal de l'animal (dades no mostrades). Per veure la integritat i estructures pancreàtiques, vam realitzar una tinció amb hematoxilina i eosina dels pàncrees, revelant l'absència de diferències evidents entre els dos grups d'estudi, tenint els animals KO un patró histològic aparentment normal (fig.71 B).

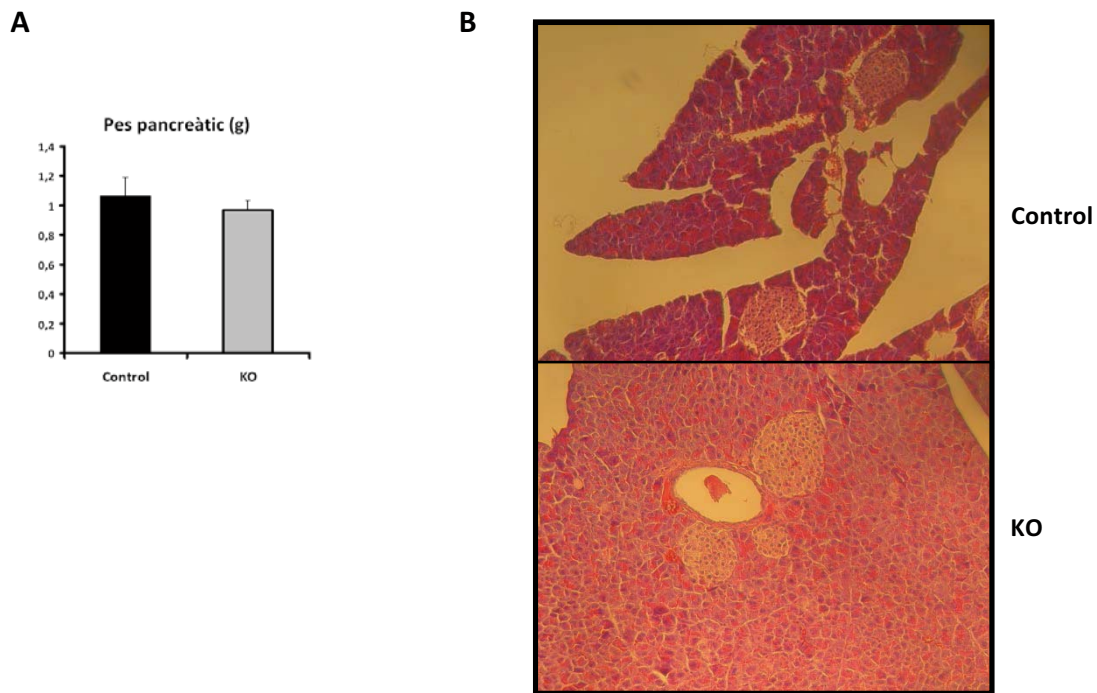


Figura 71. Pes del pàncrees d'animals de 36 setmanes i tinció hematoxilina-eosina. A) Pes del pàncrees (N=6 per grup). **B)** Fotos representatives d'una tinció hematoxilina-eosina (10x).

4.3.3. Estudi de la capacitat secretora d'insulina dels illots a alta i baixa glucosa

Donat que els animals KO de 36 setmanes mascles, presenten una insulinèmia més baixa que els animals control, hem volgut estudiar la capacitat secretora dels illots aïllats d'aquests animals. Els resultats ens mostren que no hi ha diferències entre ambdós grups (fig.72). Els animals KO presenten una secreció d'insulina, tant a una concentració de glucosa basal (2,8mM) com front una concentració elevada de glucosa (16,7mM) similar a la dels illots d'un animal control. Aquests resultats ens fan descartar defectes en la secreció d'insulina en resposta a la glucosa en animals KO.

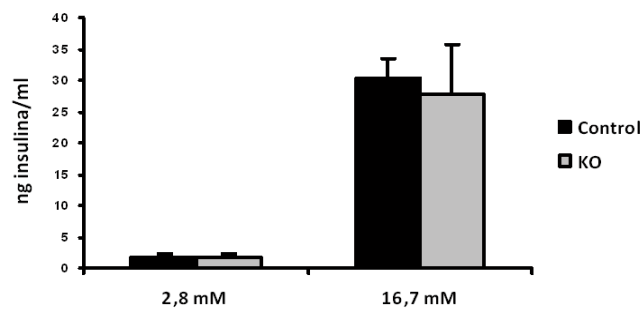


Figura 72. Capacitat secretora d'insulina d'illots aïllats d'animals de 36 setmanes mascles. Gràfic representatiu d'un animal control i d'un KO que mostra no diferències entre ambdós grups d'animals en resposta a baixa i altra glucosa. N=3. Mitjana±Sem.

4.3.4. Estudi de l'expressió gènica dels illots pancreàtics

Per profunditzar a nivell molecular en l'efecte que pot tenir l'absència de Math6 en les cèl·lules endocrines del pàncrees, vam avaluar l'expressió gènica dels illots dels ratolins de 36 setmanes i vam estudiar possibles diferències en les hormones majoritàries de l'illot. Únicament, observem un augment relatiu no significatiu del 30% en el mRNA del gen del glucagó en el grup dels animals KO, la resta d'hormones romanen intactes (fig.73).

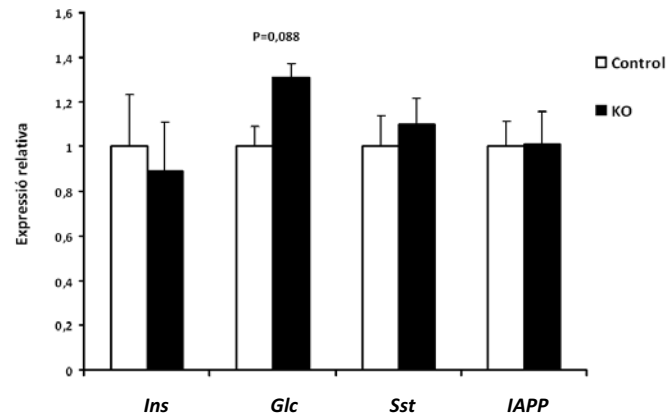


Figura 73. Nivells relatius de mRNA de les hormones pancreàtiques en illots de Langerhans aïllats de ratolins mascles de 36 setmanes d'edat. L'expressió de cada hormona es va normalitzar emprant l'expressió de Tbp/Actb i les dades s'expressen en relació al valor dels illots d'animals control normalitzat a 1. N=6 en els controls i N=7 en el grup dels KO. Mitja±Sem.

4.4. Caracterització del pàncrees dels animals KO durant el desenvolupament embrionari

L'anàlisi morfològica del pàncrees a P1 i els estudis realitzats en animals adults, indiquen que l'eliminació de Math6 durant el desenvolupament embrionari no té efectes dramàtics sobre l'especificació i formació de les cèl·lules endocrines, a excepció d'un augment moderat del nombre de cèl·lules somatostatina positives. Per tant, Math6 no sembla ser essencial per a l'activació del programa de diferenciació endocrina del pàncrees. Tot i això, no podem descartar que la seva absència sigui compensada per alguna altre factor de transcripció, o que els seus efectes quedin amagats per mecanismes compensatoris durant el desenvolupament normal de l'òrgan. Per aquesta raó, hem considerat interessant fer una anàlisi dels perfils d'expressió gènica del pàncrees durant el desenvolupament embrionari, poc després que Math6 comença a expressar-se a l'epiteli pancreàtic. Basant-nos en el perfil d'expressió de la proteïna GFP en animals knockin GFP-Cre en el locus gènica de Math6 (Dr.Lynn i dades no mostrades), hem conclòs que Math6 s'expressa a l'epiteli pancreàtic després de e13.5 (a e12.5 Math6 comença a expressar-se però només al mesènquima que envolta aquest epiteli). Per aquesta raó, ens hem centrat en els estadis e14.5 i e15.5, els quals són moments

crucials en el procés de diferenciació endocrina, sent e15.5 el punt àlgid de la transició secundària i quan es detecten un major nombre de cèl·lules progenitores Neurog3 positives.

4.4.1. Anàlisi morfomètrica d'animals a e15.5

Abans d'estudiar el perfil d'expressió gènica en el pàncrees embrionari, hem determinat la presència de cèl·lules endocrines a l'estadi e15.5 (fig.74). A primera instància, no observem diferències quant a la distribució i localització de les cèl·lules insulino-positives o glucagó-positives entre embrions KO i control. L'estudi morfomètric més detallat del compartiment β (insulino-positiu) no revela canvis significatius en l'àrea total d'aquest tipus cel·lular. Sí s'aprecia en concordança als resultats prèviament mostrats, un petit increment en l'àrea total de pàncrees analitzada pels animals KO ($3,5 \pm 1,2$ vs $5,3 \pm 0,7$ mg).

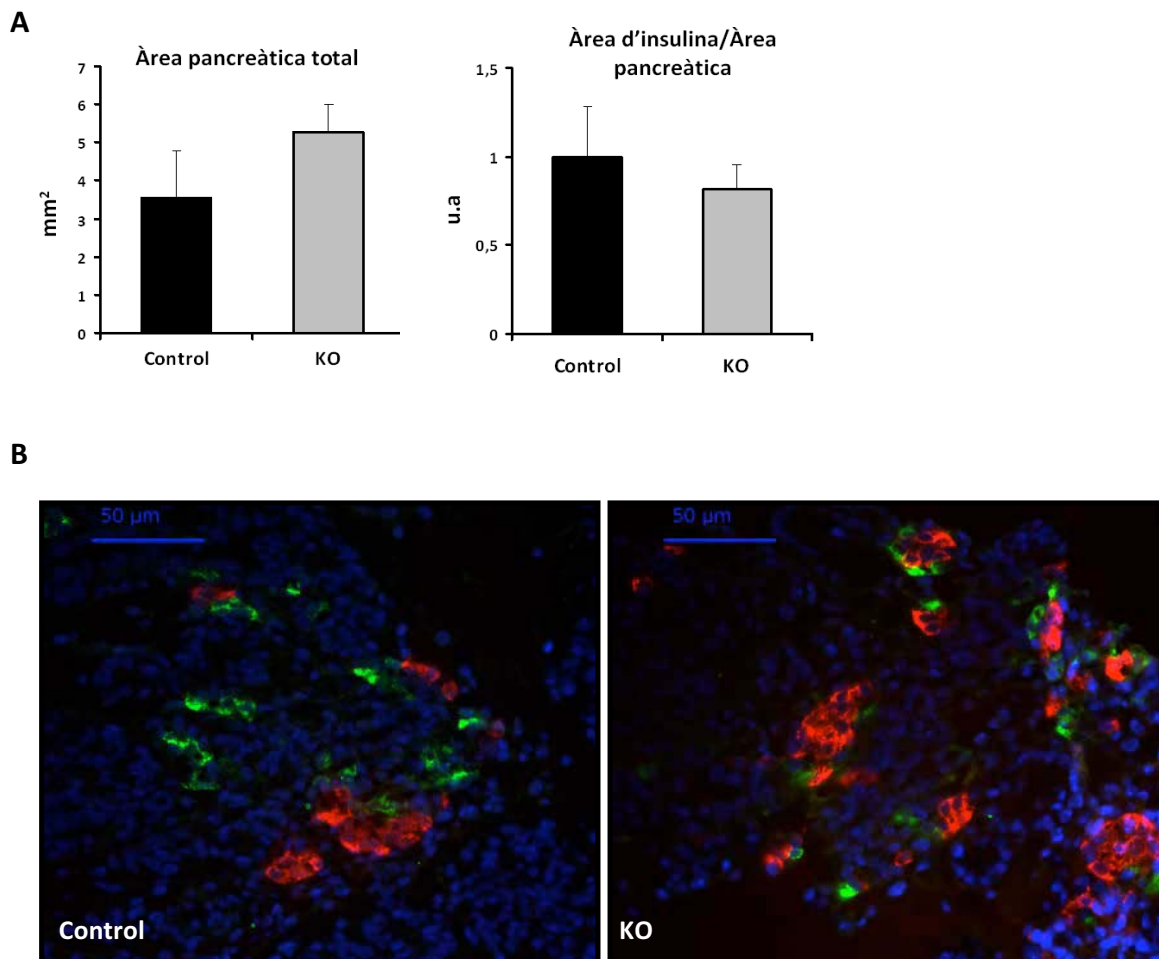


Figura 74. Immunodetecció i anàlisi d l'expressió d'insulina a estadi embrionari e15.5. A) Es van analitzar un total de 3 animals per grup. Mitjana \pm Sem. (u.a = unitats arbitràries). **B)** Imatge representativa de la tinció per insulina (verd) i glucagó (roig).

4.4.2. Estudi de l'expressió gènica pancreàtica a e14.5 i e15.5

4.4.2.1 Marcadors endocrins

Hem estudiat els nivells de mRNA de diferents marcadors de diferenciació endocrina incloent factors de transcripció claus i marcadors de cèl·lules diferenciades a e14.5 i e15.5.

A e14.5, observem que l'expressió dels gens de diferenciació endocrina com *Neurog3*, *NeuroD1* i *Nkx6.1* estan significativament disminuïts en els embrions KO en relació als embrions control. Altres factors, com *Pdx1* que en aquest estadi es troba expressat a tot l'epiteli pancreàtic no només en cèl·lules endocrines, no es veu afectat. De la mateixa manera els gens *Arx* i *Pax4*, no presenten modificacions en els seus perfils d'expressió en cap de les dues etapes estudiades (fig.75). Sorprenentment, la disminució en l'expressió de la majoria d'aquests gens desapareix a e15.5, a excepció de *Nkx2.2* que no és fins e15.5 que es veu significativament disminuït. Aquests resultats suggereixen que l'absència de *Math6* podria estar provocant un alentiment temporal en l'inici del programa de diferenciació endocrina, més que afectar la capacitat d'activació o la progressió d'aquest programa.

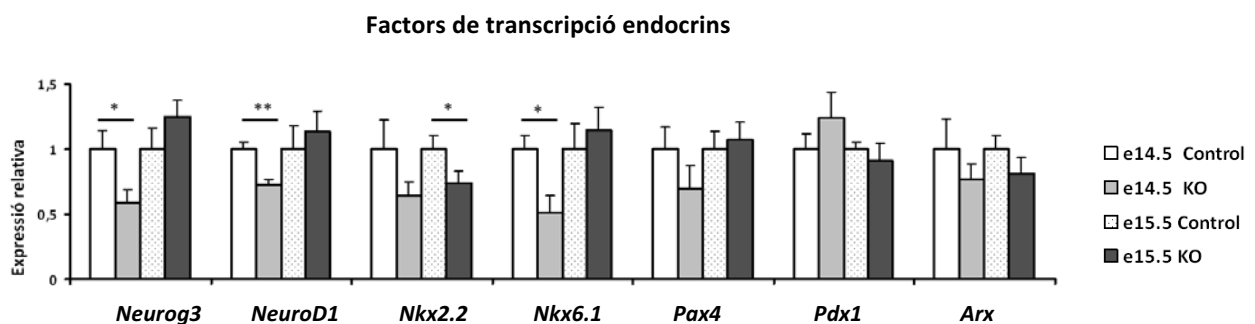


Figura 75. Expressió gènica de marcadors endocrins en animals KO a l'estadi de desenvolupament e14.5 i e15.5. Es van recollir els primordis pancreàtics a les edats indicades i se'n va extreure el RNA total. Els nivells d'expressió dels gens indicats van ser analitzats per qRT-PCR. Els resultats estan expressats en relació al control que se li ha donat el valor de 1. Mitjana±Sem. Test estadístic t-Student. *P < 0,05; ** P < 0,01 vs control. L'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *Tbp*. (N=7 per grup dels animals e14.5 i N=10 per animals e15.5).

Vam analitzar també si els canvis observats en l'expressió de gens de diferenciació endocrina es traduïen en canvis en l'expressió dels gens de les hormones endocrines. Tal com mostra la figura 76, hi ha una tendència a una menor expressió d'*Ins* (*Ins1+Ins2*) i *Glc* a e14.5 que desapareix a e15.5, tal com hem descrit amb els factors endocrins. Aquests resultats han estat corroborats a nivell morfològic en el cas de la insulina (veure apartat 4.4.1). En canvi, aquesta disminució no es veu pel mRNA de la *Sst*. Cal destacar, que les cèl·lules *Sst* positives no són evidents al pàncrees fins a e15.5

mentre que cèl·lules positives per insulina i glucagó es detecten des d'etapes molt inicials de la formació d'aquest òrgan.

Per últim, vam determinar l'expressió dels mRNAs dels gens *IAPP* i *Gck*, l'expressió dels quals havíem vist significativament afectada pel shMath6 a les cèl·lules ductals mPAC (veure *apartat 2.2.2.*). Pel que fa a l'expressió del *IAPP* roman invariable mentre que observem una disminució significativa de l'expressió de *Gck* a e15.5 (fig.76). Aquest darrer resultat coincidiria amb les dades *in vitro* on havíem observat el bloqueig de l'activació del gen *Gck* en resposta a Neurog3 en presència del shMath6.

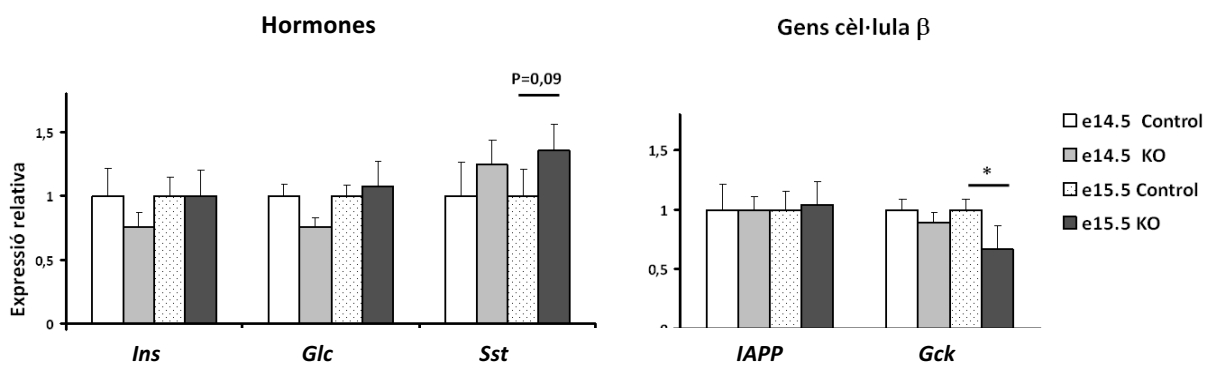


Figura 76. Expressió gènica d'hormones endocrines i gens específics de cèl·lula β en animals KO a l'estadi de desenvolupament e14.5 i e15.5. Es van recollir els primordis pancreàtics a les edats indicades i se'n va extreure el RNA total. Els nivells d'expressió dels gens indicats van ser analitzats per qRT-PCR. Els resultats estan expressats en relació al control que si li ha donat el valor de 1. Mitjana±Sem. Test estadístic t-Student. *P < 0,05 vs control. L'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *Actb*. (N=7 per grup dels animals e14.5 i N=10 per animals e15.5).

4.4.2.2. Marcadors exocrins

El gen de *Math6* és activat *in vitro* pel factor bHLH *Ptf1a*, el qual funciona com a regulador essencial del programa de diferenciació exocrina al pàncrees. Per tant, és possible que la seva absència pugui provocar alteracions d'aquest programa en el pàncrees dels animals KO. A més a més, cal destacar que *Math6* (GFP) es troba molt expressat en els acins en diferenciació a e15.5 (dades no mostrades). Concretament, hem determinat l'expressió dels mRNAs del gen de l'amilasa (*Amy*), del factor bHLH pro-exocrí *Ptf1a* i del factor de transcripció essencial per al compartiment acinar *Mist1* (fig.77). No observem canvis significatius per cap dels tres factors estudiats, però pel que fa a l'expressió d'*Amy*, observem una alteració en el perfil d'expressió entre dos estadis de desenvolupament, però degut a la gran variabilitat obtinguda no obtenim canvis significatius. Aquesta gran variabilitat en l'expressió del gen d'aquest enzim podria estar ocasionat pel perfil d'expressió que té. El gen *Amy* augmenta de manera abrupta entre e14.5 i e15.5, i una diferència de poques hores en l'edat dels embrions es pot traduir en diferències notòries en la seva expressió.

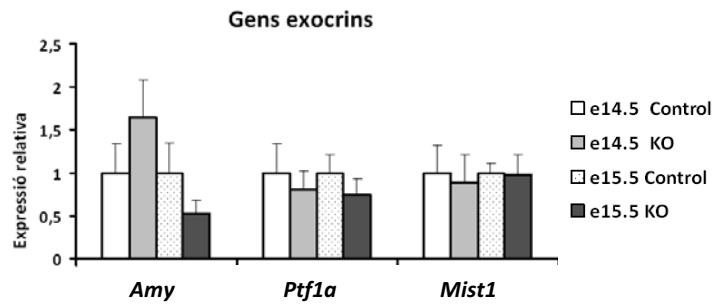


Figura 77. Expressió gènica de marcadors endocrins i exocrins en animals KO a l'estadi de desenvolupament e14.5 i e15.5. Es van recollir els primordis pancreàtics a les edats indicades i se'n va extreure el RNA total. Els nivells d'expressió dels gens indicats van ser analitzats per qRT-PCR. Els resultats estan expressats en relació al control que se li ha donat el valor de 1. Mitjana±Sem. L'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *Actb*. (N=7 per grup dels animals e14.5 i N=10 per animals e15.5).

4.4.2.3. Gens modificats pel shMath6 *in vitro*

Basant-nos en les dades *in vitro* derivades dels estudis realitzats amb el shMath6 en l'objectiu 2, on vam identificar diversos gens com a possibles dianes de Math6, hem estudiat l'expressió d'alguns d'aquests gens en els embrions KO a fi de determinar si aquests gens són regulats per Math6 *in vivo*. En primer lloc, hem estudiat dos dels gens de cicle. L'expressió de *Mad2l2* està augmentada, en sentit contrari als resultats *in vitro*, i l'expressió de *Cdk1* disminuïda, igual que en els resultats obtinguts *in vitro*. *Mad2l2* s'uneix al complex APC-Cdc20 inhibint-lo i aturant la progressió de la mitosi. Per tant aquests dos canvis produïrien una disminució de la proliferació, estudiada mitjançant el marcador de proliferació Ki67, on no observem canvis (fig.78).

En segon lloc, també hem estudiat l'expressió del gen de la histona metiltransferasa *SetD7* inhibida pel shMath6 en els estudis *in vitro*, el qual no es veu modificat en els animals KO. Per últim, l'expressió de *Bambi*, un inhibidor de la via dels BMPs, augmentada pel shMath6 *in vitro*, es veu disminuïda en els animals KO a e15.5, tot i que la seva funció en el pàncrees és desconeguda.

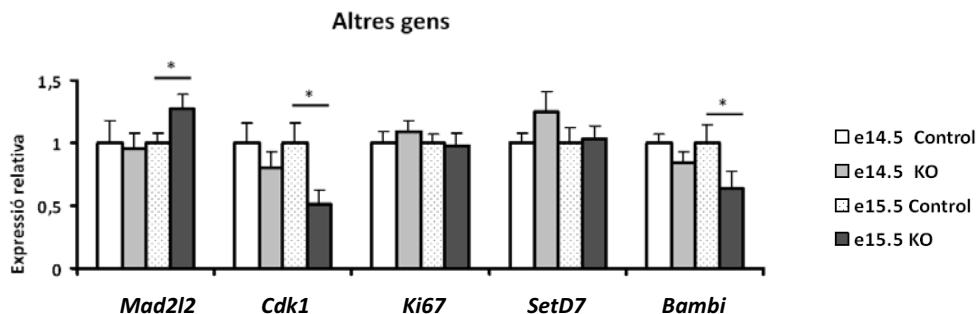


Figura 78. Expressió gènica de gens vinculats amb el cicle cel·lular en animals KO a l'estadi de desenvolupament e14.5 i e15.5. Es van recollir els primordis pancreàtics a les edats indicades i se'n va extreure el RNA total. Els nivells d'expressió dels gens indicats van ser analitzats per qRT-PCR. Els resultats estan expressats en relació al control que se li ha donat el valor de 1. Mitjana±Sem. Test estadístic t-Student. *P < 0,05 vs control. L'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *Tbp*. (N=7 per grup dels animals e14.5 i N=10 per animals e15.5).

4.4.3. Nombre de progenitors endocrins

Tal com hem indicat anteriorment, l'eliminació de *Math6* podria estar endarrerint lleugerament la inducció del programa endocrí al pàncrees. Prèviament, el nostre grup havia descrit l'efecte negatiu de *Math6* sobre l'autoregulació positiva del gen *Neurog3* i, en aquest sentit, hem hipotetitzat que *Math6* podria tenir un paper negatiu sobre la regulació del nombre de progenitors endocrins (cèl·lules *Neurog3+*) en el pàncrees en desenvolupament. L'anàlisi d'expressió gènica no és massa informativa en aquest sentit doncs el mRNA de *Neurog3* es troba expressat a més cèl·lules que la proteïna, indicant certa regulació post-transcripcional en l'expressió d'aquest factor essencial per a la diferenciació endocrina [75]. Per aquesta raó, vam realitzar el comptatge del nombre de cèl·lules *Neurog3+* al pàncrees de e15.5, moment en el qual s'observa un nombre màxim d'aquestes cèl·lules [81] (fig.79). Aquest comptatge demostra un augment del nombre de progenitors endocrins en un 40% als pàncrees dels embrions KO respecte al control.

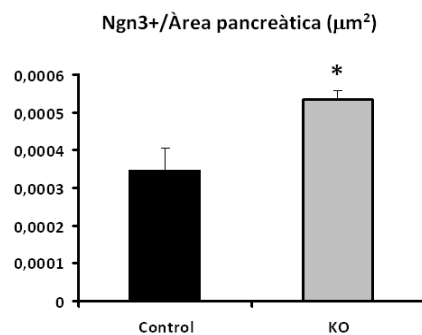


Figura 79. Immunodetecció i anàlisi d l'expressió de progenitors endocrins *Neurog3+* a e15.5. Immunofluorescència de primordis pancreàtics de e15.5 emprant un anticòs anti-*Neurog3*. Es van analitzar un total de 3 animals per grup. Mitjana \pm Sem. Test estadístic t-Student. *P < 0,05 vs control.

4.5. Anàlisi de proliferació del pàncrees en desenvolupament

Donat que 1) la regulació de cicle cel·lular va ser identificada com la funció principal de *Math6* a les cèl·lules mPAC i 2) que alguns dels gens de cicle identificats com a dianes potencials de *Math6 in vitro* també es veuen modificats en els embrions gen-anul·lats per *Math6* i 3) els animals KO presenten un lleuger augment de la grandària del pàncrees, hem examinat si l'eliminació de *Math6* podria tenir un efecte general sobre la proliferació pancreàtica durant el desenvolupament. Per aquesta raó, hem estimat la taxa proliferativa de l'epiteli pancreàtic d'embrions a e13.5 (*Math6* no es detecta en l'epiteli pancreàtic) i a e15.5 (*Math6* es troba expressat àmpliament per tot l'epiteli) mitjançant el marcador de proliferació fosfo-histona3 (Ph3) (fig.80), el qual marca cèl·lules que estan en mitosi. A

e13.5, abans de l'inici de la transició secundària, la proliferació és alta i similar entre KO i controls, fet que suggereix que no hi ha alteracions en la proliferació dels progenitors pancreàtics en absència de Math6. A e15.5, pic de la transició secundària, observem que la proliferació a l'epiteli pancreàtic és clarament menor que a e13.5 (disminueix en gairebé un ordre de magnitud) però els valors segueixen sent similars entre embrions KO i controls. Detectem un lleuger augment del nombre de cèl·lules Ph3+ en els animals KO, però amb les dades disponibles fins ara no assoleix significança estadística (+10%, $p=0,11$).

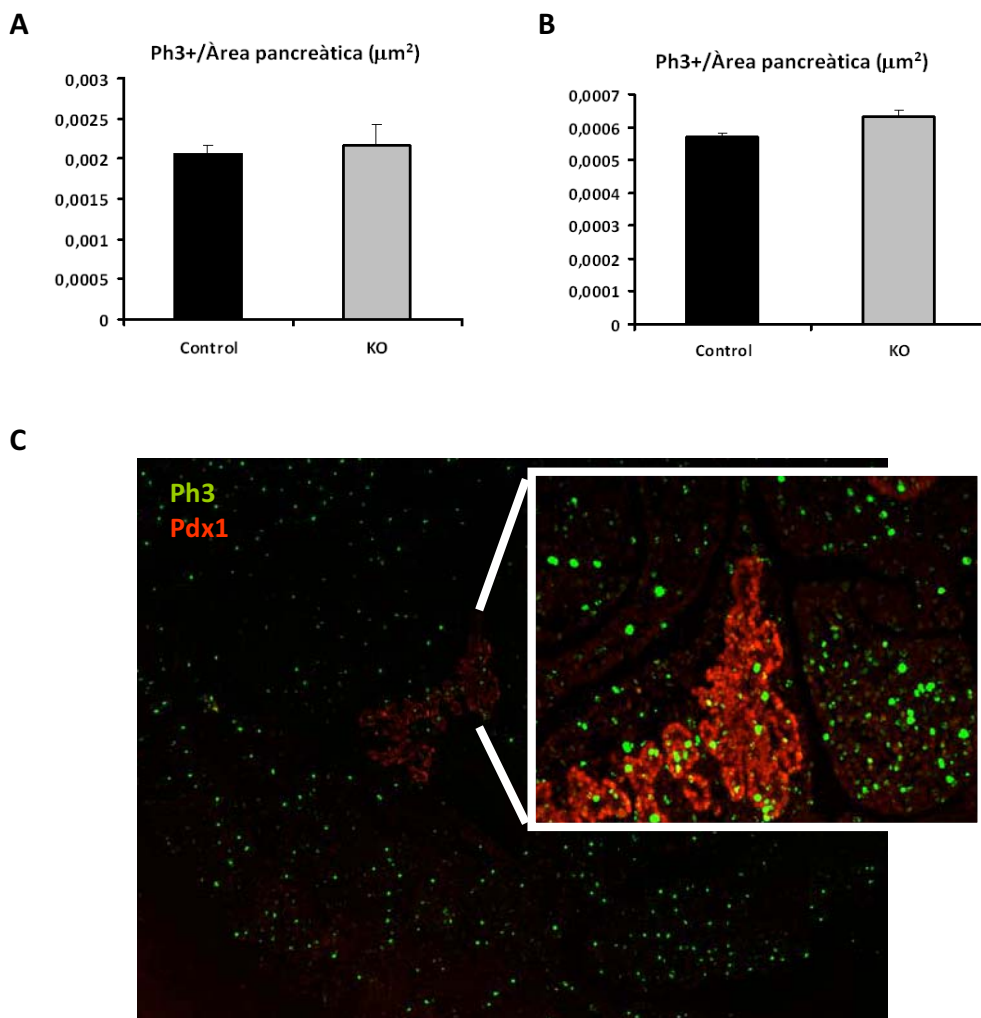


Figura 80. Immunodetecció i anàlisi d l'expressió del marcador de proliferació Ph3 a e13.5 i e15.5. **A)** Immunofluorescència d'embrions sencers de e13.5 emprant un anticòs anti-Ph3 i com a marcador de l'epiteli pancreàtic un anticòs anti-Pdx1. **B)** Immunofluorescència de primordis pancreàtics de e15.5 emprant anti-Ph3 i Foxa2 com a marcador de l'epiteli pancreàtic. **C)** Imatge representativa d'una immunofluorescència Ph3/Pdx1 a un embrió e13.5. Es van analitzar un total de 3 animals per grup. Mitjana \pm Sem.

V. DISCUSSIÓ

La diabetis *Mellitus* és un dels problemes de salut més importants del segle XXI que afecta tota la població mundial. És una de les principals causes de mort en els països subdesenvolupats, i les complicacions de salut que se'n deriven tenen enormes costos econòmics per a la societat. Tot i els avenços i millores que s'han dut a terme en la insulinoteràpia, els pacients afronten greus problemes de salut i complicacions. Per aquest motiu, és necessari trobar nous fronts per una possible cura de la diabetis.

L'estudi dels mecanismes que controlen la generació de les cèl·lules pancreàtiques durant el desenvolupament, permetrà l'optimització i millora de la generació de protocols de teràpia cel·lular destinats al tractament de la diabetis, i al desenvolupament d'estratègies per la regeneració de teixits. L'**embriologia traslacional**, proposa l'aplicació de principis embriològics al desenvolupament de protocols destinats a la creació de cèl·lules adultes funcionals a partir de fonts cel·lulars renovables com les cèl·lules mare. La diabetis és una malaltia en la que un tipus cel·lular, la cèl·lula β , és defectiva o absent, amb el que es converteix en un candidat idoni per a l'aplicació de protocols de medicina regenerativa. Diferents estudis demostren que l'estratègia més prometedora per a la generació de cèl·lules endocrines pancreàtiques *in vitro* és la recapitulació pas a pas del procés de diferenciació que segueix aquest tipus cel·lular durant l'embriogènesi [152, 153]. En aquest context els estudis sobre les bases moleculars de la diferenciació pancreàtica són particularment rellevants.

Els factors de transcripció de la família bHLH, tenen un paper fonamental en els processos de determinació i diferenciació de diferents teixits durant el desenvolupament embrionari. En concret, la importància del factor bHLH Neurog3 durant el desenvolupament pancreàtic ha estat demostrat per la generació del seu model murí gen-anul·lat. Aquests ratolins neixen amb una mancança total de cèl·lules endocrines pancreàtiques, sense mostrar un augment en els processos apoptòtics, fet que indica que Neurog3 es requerida per la formació dels 5 tipus cel·lulars endocrins del pàncrees [32]. No obstant, malgrat la reconeguda rellevància d'aquest factor en el programa de diferenciació endocrina, els mecanismes moleculars activats per Neurog3 són encara poc coneguts. Per tant, és de gran importància identificar els gens diana regulats de forma directa per Neurog3 per entendre millor la seva funció, i en conseqüència, poder ampliar el nostre coneixement de les etapes inicials del procés de diferenciació endocrina en el pàncrees. En aquesta línia de recerca i utilitzant tecnologies de *microarrays* d'expressió, Math6 va ser identificat com un possible factor activat per Neurog3 [34].

Math6 va ser inicialment identificat en el desenvolupament neural l'any 2001 [85]. Des d'aleshores s'ha descrit la seva implicació en la formació de diferents teixits en ratolí, pollet i peix zebra que

demostren que és indispensable en estadis primerencs del desenvolupament, però es desconeixen les seves funcions específiques.

El nostre grup va descriure Math6 com un nou component de la cascada transcripcional del pàncrees l'any 2008, i va demostrar la seva presència en els precursors endocrins per sota de l'expressió de Neurog3 *in vivo* [87]. De fet, Math6 es va identificar com a gen regulat per Neurog3 en cèl·lules ductals de ratolí [34] i més recentment confirmat com a diana directa [91]. De forma interessant, Math6 sembla tenir una activitat transcripcional repressora i modular les funcions pro-endocrines de Neurog3 en els progenitors endocrins [87]. La generació dels ratolins gen-anul·lats per Math6 va demostrar que a més a més del seu possible paper en diferenciació d'òrgans i teixits, Math6 està involucrat en estadis inicials de l'embriogènesi ja que els animals moren durant la gastrulació.

En aquesta tesi, hem investigat el paper del factor de transcripció bHLH Math6 en el programa de diferenciació endocrino-pancreàtica promogut per Neurog3. Amb aquesta finalitat, hem caracteritzat bioquímicament la seva activitat transcripcional i hem emprat models cel·lulars de pèrdua i guany de funció així com un model murí gen-anul·lat específic de pàncrees per tal d'identificar els gens diana i processos cel·lulars regulats per aquest factor.

FUNCIÓ DUAL DE MATH6 COM A REPRESSOR O ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL FEBLE

Math6 és un factor de transcripció de la superfamília bHLH. El seu domini bHLH s'assembla més al dels factors Neurog3/NeuroD1 que a cap altre bHLH, fet que va portar a classificar-lo dins de la subfamília de factors *atonal* [154]. No obstant, a l'inici d'aquesta tesi, l'escassa informació disponible sobre Math6 indicava que no compartia amb els factors Neurog3/NeuroD1 l'activitat pro-endocrina (promoció de diferenciació endocrina) *in vitro*, fet que podria indicar una ràpida divergència de Math6 associada amb l'adquisició de noves funcions. A més a més, Math6 conserva una valina en el residu 13 de la regió bàsica del domini bHLH típica de la classe A de proteïnes d'aquesta família, però al igual que el seu ortòleg en mosca *net*, no actua com activador transcripcional [83]. Per tant, el primer objectiu d'aquesta tesi doctoral va ser entendre com Math6 funciona com a regulador transcripcional i estudiar els possibles dominis involucrats en la seva activitat.

Els primers assajos *one hybrid* ens confirmen que Math6 és incapaç d'activar cap de les caixes E canòniques per ell mateix. En canvi, Math6 produeix la inhibició de les activacions produïdes pels dímers E47/E47 a caixes CAGCTG i Neurog3/E47 a caixes CATATG. El mecanisme molecular responsable d'aquesta repressió podria ser la unió de Math6 a E47, disminuint així la quantitat disponible d'aquesta proteïna E. No podem descartar però que la formació d'heterodímers

Math6/E47 s'uneixi a caixes E però tingui una activitat més dèbil que E47/E47 o Neurog3/E47. Per tant, restaria per confirmar si Math6 es capaç d'unir-se o no a aquestes seqüències de DNA. Dades no publicades del nostre grup indicarien que homodímers de Math6 o heterodímers Math6/E47 no s'uneixen a les caixes CAGCTG mitjançant EMSA, suggerint en aquest cas més l'opció d'un segrestament d'E47 com a mecanisme de l'activitat repressora produïda.

No obstant, els assajos *one hybrid* tot i ser una eina amb limitacions, ens han sigut claus a l'hora de demostrar que Math6 també té una **activitat transcripcional intrínseca repressora**, és a dir, que reprimeix promotors diana quan s'uneix directament al DNA mitjançant un domini d'unió al DNA heteròleg (Gal4UAS). Aquests assajos també ens han permès poder identificar el domini ric en prolines (PRR) de Math6 com a domini important per aquesta activitat. És interessant el fet que aquest domini també es troba en el seu ortòleg en mosca *net*, el qual també ha estat descrit com a repressor transcripcional. Math6 podria estar emprant aquest domini per recaptar corepressors i altres proteïnes reguladores transcripcionals i d'aquesta manera produir la seva activitat repressora. Aquest és un mecanisme emprat per altres proteïnes com el regulador de cicle p53, que recapta mSin3a mitjançant el seu domini ric en prolines per reprimir l'expressió de determinats gens [155]. Però encara queda per resoldre com Math6 reprimeix la transcripció i quins corepressors poden estar implicats. Les úniques dades concloents que hem obtingut en referència a aquest aspecte de la repressió de Math6 és que no està mitjançada per metilases o deacetilases. Una altra troballa interessant derivada d'aquests assajos és que la seva capacitat de repressió no és dependent del domini bHLH, és a dir, que la seva interacció amb altres proteïnes bHLH no sembla ser imprescindible per a que Math6 pugui reprimir la transcripció.

Els resultats obtinguts tant amb promotors dependents de caixes E com en assajos *one hybrid* apunten doncs que Math6 reprimeix la transcripció, bé per segrestament de proteïnes E ubiqües o bé de manera intrínseca per reclutament de corepressors. Un resultat inesperat en els assajos *one hybrid*, ha estat com Math6 en presència d'un excés d'E47 pot passar de reprimir a activar la transcripció. Una possible explicació per aquesta observació és que Math6 pot estar formant complexos multiproteics amb corepressors i altres proteïnes produint una activitat repressora (fig.81). En canvi, l'escenari canvia en presència d'E47, on una possible major afinitat de Math6 per E47 pot estar desplaçant aquests corepressors, permeten que es formin dímers activadors, i que per tant, hi hagi un augment de l'activitat transcripcional. A més a més, els nostres resultats demostren que la cua C-terminal de Math6 és important per a la unió d'ambdós factors i/o desplaçament d'hipotètics corepressors.

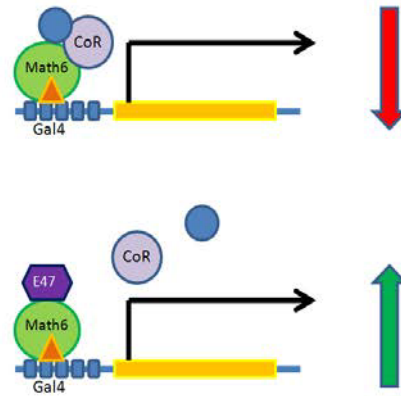


Figura 81. Model hipotètic per explicar la capacitat repressora intrínseca de Math6 emprant el sistema *one hybrid*, i que aquesta es perdi en presència d'E47.

Els resultats obtinguts en els experiments anteriors confirmen que Math6 no s'assembla funcionalment als factors Neurog3 i NeuroD1 on havia estat inicialment classificat [154]. Una revalorització filogenètica més recent de la superfamília bHLH que ha tingut en compte tota la seqüència proteica en lloc de només el domini bHLH [57], ha situat Math6 pròxim al grup de bHLH hematopoètics Tal1 i Lyl1 (fig.82). De fet, les nostres dades indiquen que a nivell funcional Math6 comparteix més amb aquest grup de proteïnes que amb el grup *atonal*. La majoria de bHLH específics de teixit requereixen la heterodimerització amb proteïnes E, característica que hem pogut veure també amb Math6. Però a diferència del perfil observat amb Neurog3, on sempre s'observa activació en presència d'E47, Math6 té un perfil més similar a Tal1, el qual s'ha demostrat que pot activar o reprimir la transcripció depenent del context cel·lular. Aquesta habilitat per regular l'expressió gènica de Tal1, és dependent a la seva integració en complexos multifactorials els quals contenen altres reguladors essencials [156]. A més a més, heterodimers de Tal1 o Lyl1 amb E47 fan disminuir la formació d'homodimers E47/E47 i són activadors febles de la transcripció, un efecte també vist amb Math6 (fig.34). No obstant, el mecanisme pel qual esdevenen aquesta varietat d'efectes transcripcionals romanen per caracteritzar.

Una altra evidència que dóna suport a la hipòtesi que Math6 s'assembla funcionalment als factors Tal1/Lyl1, és el mòdul regulador identificat en un grup reduït de gens que són activats per Neurog3 i reprimits per Math6 (*apartat 2.1.5.*). L'estudi de les zones promotores d'algunes d'aquestes dianes de Neurog3 regulades negativament per Math6 mitjançant el PAP software identifica llocs d'unió per Gata, E47, Lmo, etc. els quals formen complexos multidimèrics amb Tal1, significat que Math6 també ho podria estar fent de la mateixa manera. Una pregunta clau que queda per resoldre és la identitat de les proteïnes que poden formar complexos amb Math6 a part d'E47, pregunta que podríem resoldre mitjançant l'aplicació d'assajos *two hybrid*, però aquest treball seria motiu d'un

altra tesi doctoral. Un possible candidat és la família de corepressors Eto, els quals s'uneixen a zones riques en prolines (PPLXP) de repressors i altres proteïnes per regular la transcripció de gens específics [157, 158]. Curiosament el corepressor Eto2, coordina la proliferació i diferenciació cel·lular durant l'eritropoesi, mitjançant la interacció amb el factor de transcripció Tal1 [159]. Hem intentat determinar si Math6 podria interaccionar funcionalment amb Eto2 amb assajos *one hybrid* però degut al potent efecte repressor d'Eto2 per sí sol, ens ha estat impossible arribar a cap conclusió sobre aquesta qüestió (dades no mostrades).

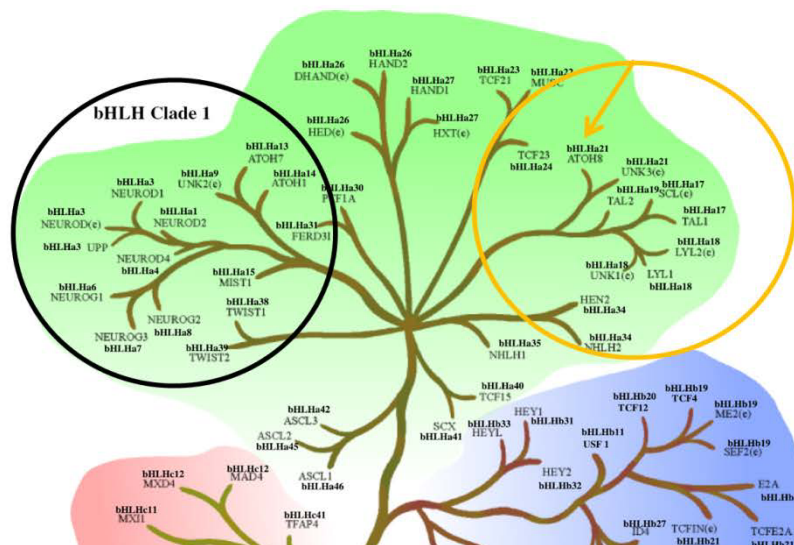


Figura 82. Figura extreta de l'article Stevens J.D. et al. Differentiation (2008) 76:1006–1022 per il·lustrar com Math6 ha sortit de la subfamília de bHLH *atonal* a la família de factors Tal.

En conclusió, Math6 és un factor bHLH que pot reprimir la transcripció però també funcionar com a activador transcripcional feble en funció del context cel·lular. En aquest sentit, els nostres resultats indiquen que Math6 és més similar a la família de factors Tal i Lyl, que als Neurog3 i NeuroD1. Aquesta informació pot ser útil a l'hora d'interpretar futurs resultats.

LA SOBREXRESSIÓ DE MATH6 BLOQUEJA L'ACTIVACIÓ D'UN GRUP DE GENS DIANA DE NEUROG3

Complementàriament als estudis bioquímics de Math6, hem realitzat els experiments de sobreexpressió o guany de funció, que ens han permès confirmar que Math6 per ell mateix no pot promoure el programa d'expressió gènica endocrí com ho fa Neurog3 o NeuroD1 en les cèl·lules mPAC [34]. Per tant, confirmant les dades bioquímiques prèvies, Math6 és un factor funcionalment diferent a la subfamília Neurog3/NeuroD malgrat les similituds existents entre els seus dominis bHLH. A més a més, hem observat com Math6 té una activitat transcripcional pràcticament nul·la, sent el

nombre de gens modificats per la seva sobreexpressió molt baix, tots ells induïts, i amb un grau de canvi produït també molt baix (com a màxim d'un factor de canvi de 1,8). Una primera interpretació d'aquests resultats ens va portar a considerar que això pogués estar relacionat amb una manca de cofactors necessaris per a l'activació de Math6 a les cèl·lules mPAC i que alguns d'aquests cofactors fossin induïts per la mateixa Neurog3. Un altra possible interpretació seria que les cèl·lules mPAC no expressin les seves dianes de forma endògena.

Per resoldre aquesta qüestió, vam co-expressar Math6 i Neurog3 simultàniament. La co-expressió de Math6 i Neurog3 va portar al bloqueig significatiu d'un nombre reduït de gens diana de Neurog3, mostrant cert grau d'interacció funcional entre ambdós factors. Podria ser que Math6 actués com un repressor de la diferenciació? Estudis derivats d'altres teixits suggereixen que sí. L'ortòleg de Math6 en pollet, Cath6, s'ha identificat com un element inhibidor de la diferenciació neuronal en la retina durant el desenvolupament. Es precisa la unió al DNA de Cath6 per mantenir el estat indiferenciat de les cèl·lules neuronals de la retina [90].

Aquest cert grau d'interacció funcional entre Math6 i Neurog3 i, afegint el fet que Math6 i Neurog3 poden co-immunoprecipitar en els mateixos complexos nuclears [87], suggereix la possibilitat que Math6 estigui sent reclutat a algun dels *loci* de les dianes de Neurog3. Seria interessant veure si Math6 s'uneix al DNA, a les seqüències promotores d'alguns d'aquests gens, i els resultats derivats dels experiments de l'*apartat 2.1.3*, on hem emprat adenovirus recombinants per sobreexpressar dues formes de Math6, una sense bHLH (Math6 1-232aa) i un altra sense domini bàsic d'unió al DNA (Math6 Δ Basic) ens suggereixen certes diferències en funció del gen diana en estudi. Amb la forma de Math6 que no conté el bHLH, Math6 1-232aa, hem vist que totes les dianes deixen de reprimir-se a excepció de la *Sst*, suggerint dues coses, 1) que és necessària la unió de Math6 al DNA per exercir aquest efecte negatiu, i/o 2) que inhibeix la transcripció per segrestament de proteïnes E ubiqües. En segon lloc per tal de discernir entre aquestes dues possibilitats vam generar l'adenovirus Math6- Δ Basic, codificant per una forma de Math6 que no conté el domini bàsic d'unió al DNA però sí el de dimerització HLH, el qual ens ha permès distingir si la repressió es deu a un segrestament d'E47 o requereix la unió de Math6 al DNA. Aquests estudis han posat de manifest que entre les dianes de Neurog3 reprimides per Math6 hi conviuen aquests dos tipus d'efectes. Si bé en la majoria dels casos, sembla ser que cal que Math6 s'uneixi al DNA per a que reprimeixi l'activació, en altres casos com *Neurog3*, *Coro2b* i *Rab3c*, aquesta unió no sembla necessària. Per tant, els mecanismes de repressió de Math6 són gen-específics.

Una característica comuna entre el grup de gens induïts per Neurog3 i reprimits per Math6, és que la majoria d'ells són d'inducció tardana, tots es comencen a expressar 36h post-infecció en les cèl·lules

mPAC, tal i com ja s'havien caracteritzat prèviament *NeuroD1* i *Sst* [34], mentre que la inducció de *Math6* és molt més ràpida (12h post-infecció). Això ens fa pensar en la possibilitat que Neurog3 estigui activant algun tipus de cofactor necessari per a la seva acció, i que *Math6* pugui estar interferint en aquesta activació. Les hipòtesis són varies, però és clar que existeix una interacció funcional entre ambdós factors, que *Math6* regula negativament algunes de les accions del factor pro-endocrí Neurog3, i que per tant, podria tenir algun paper funcional en aquesta cascada de diferenciació.

EL SILENCIAMENT GÈNIC DE MATH6 REVELA UNA POSSIBLE FUNCIÓ D'AQUEST FACTOR COM A REGULADOR DEL CICLE CEL·LULAR

El silenciament gènic de *Math6* en presència de Neurog3 a les cèl·lules mPAC, ens han permès identificar una sèrie de dianes gèniques i vies cel·lulars modificades per *Math6*. En concret, el seu silenciament produeix la modificació significativa de 294 gens, un canvi substancial en comparació als resultats de guany de funció. La raó per aquestes diferències no és fàcil de desxifrar, si més no, el silenciament gènic sembla a priori una aproximació més fisiològica. Un 32% d'aquestes dianes són dianes compartides amb Neurog3, destacant el fet que només uns pocs són productes coneguts de la diferenciació endocrina com el *IAPP* i *Gck*. Ambdós gens codifiquen per proteïnes de la cèl·lula β diferenciada però són induïts ja durant etapes embrionàries, tot i que la seva funció durant el desenvolupament pancreàtic roman encara per determinar. En conjunt, aquestes dades apunten a que *Math6* no interferiria de manera global amb l'activació de gens de diferenciació endocrina promoguts per Neurog3 i, a més a més, que Neurog3 està regulant altres vies cel·lulars prèviament no identificades.

No obstant, la classificació funcional del grup de gens regulats pel Ad-sh*Math6*, ens ha permès identificar el **cicle cel·lular** com a funció més representada, suggerint que *Math6* podria ser un regulador d'aquesta funció cel·lular. El paper de factors bHLH en el control del cicle cel·lular està ben documentat en diferents contextos [160-162], però cert és que es coneix ben poc sobre l'acoblament entre diferenciació i sortida de cicle durant la formació dels llinatges endocrins al pàncrees, on s'ha postulat que Neurog3 produeix una parada de la divisió cel·lular mitjançant la inducció del CKI *Cdkn1a* (p21), per finalment permetre la diferenciació terminal de les cèl·lules [130]. Però hi ha moltes altres proteïnes com factors de transcripció de determinades vies de senyalització i enzims remodeladors de la cromatina que també tenen un paper en el manteniment de la divisió cel·lular en el pàncrees [163, 164].

De quina manera els gens pro-endocrins interaccionen amb aquests factors per aturar la proliferació cel·lular i promoure la diferenciació està encara per determinar. D'aquí la rellevància del factor

Math6 com a possible nexa d'unió entre ambdós processos. Els nostres resultats indiquen que Math6 no tindria un paper rellevant en la inducció del programa d'expressió gènica endocrina promogut per Neurog3, però en canvi podria participar en la regulació de la progressió del cicle cel·lular durant l'activació d'aquest programa de diferenciació. L'estudi de l'impacte del silenciament de Math6 sobre la progressió del cicle cel·lular en les cèl·lules mPAC va mostrar una disminució de la proliferació degut probablement a l'acumulació de les cèl·lules en la transició G2/M, o a un retard en la progressió del cicle possiblement ocasionat per l'allargament d'alguna de les fases. Aquests assajos funcionals evidencien que els canvis en l'expressió gènica produïts pel silenciament de Math6 tenen un efecte real sobre el cicle en el context de les cèl·lules mPAC. Els fets que l'expressió Math6 és ubiqua i que el seu gen és activat per diversos factors de determinació bHLH específics de teixit [87], ens poden fer pensar que aquest factor podria estar actuant com a regulador de la proliferació en diversos processos de diferenciació. Aquesta hipòtesi es reforça pel fet que amb els assajos realitzats, observem que els efectes sobre el cicle cel·lular són totalment independents a l'efecte de Neurog3.

La figura 83 ens mostra un esquema dels reguladors clau en la de transició entre les fases G2 i M, alguns dels quals estarien regulats per Math6 ja sigui de forma directa o indirecta en el model cel·lular de les mPAC. Math6 sembla actuar com a promotor de cicle, i els nostres estudis suggereixen que el possible mecanisme d'acció seria mitjançant la dis-regulació del complex clau en la transició de les fases G2 i M, el complex Ccnb1/Cdk1 (CyclinB i Cdc2 en la figura 83). La Ccnb1 s'intercanvia entre en nucli i el citoplasma durant la interfase, abans d'acumular-se ràpidament en el nucli en la profase. Què produeix aquesta acumulació nuclear és encara desconegut, encara que sembla que la cinasa Plk1 inhibiria la seva exportació del nucli [165, 166]. En el nostre cas, Plk1 està disminuït pel Ad-ShMath6, fet que podria explicar l'augment discret de Ccnb1 en el citoplasma, però aquests són resultats que necessiten més estudis per ser corroborats.

En el cas de l'altre component del complex, Cdk1, observem una disminució a nivell proteic a les 24h mentre que la regulació a nivell de mRNA es produeix a les 48h. L'origen d'aquests canvis resten per determinar, però el fet que el silenciament de Math6 produeixi un augment de la fosfatasa encarregada de mantenir aquest complex inactiu Wee1, i també una disminució de la des-fosfatasa Cdc25 no mostrat degut a la manca de significació estadística ($FC=0,6$, $p=0,07$), encarregat d'activar-lo, ens indiquen un estatus inactiu del complex prevenint l'entrada a mitosi. Addicionalment, la disminució en la fosforilació de la Ser10 de la histona H3 (Ph3), un marcador que identifica les cèl·lules específicament en fase M, també està disminuït en absència de Math6, indicatiu de que el complex encarregat de fosforilar-la (Ccnb1/Cdk1) no està 100% actiu en aquesta situació. Per tant, Math6 podria estar regulant el complex Ccnb1/Cdk1 tant a nivell de la seva expressió com de la seva activitat.

També l'augment de l'inhibidor de Cdks Cdkn1a sembla un altre esdeveniment involucrat en l'efecte de Math6 sobre la regulació del cycle cel·lular. De fet hi ha un augment de Cdkn1a que seria consistent amb la inhibició del complex Ccnb1/Cdk1. No obstant, els canvis no són evidents fins les 48h tot i que l'hem identificat com a possible diana directa de Math6 en assajos d'immunoprecipitació de cromatina. La regulació de Cdkn1a per altres bHLH ja havia estat prèviament identificada en altres teixits [167, 168].

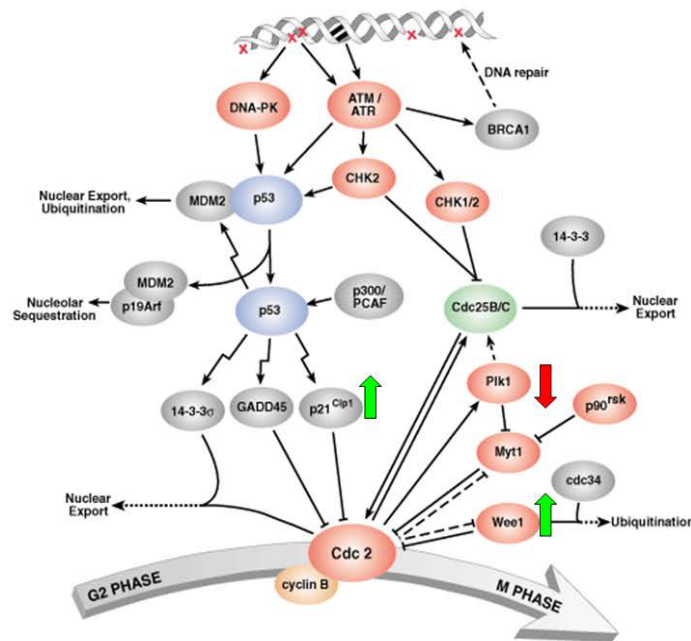


Figura 83. Representació del G2/M checkpoint per prevenir l'entrada en mitosis en cas d'algun tipus de dany genòmic o altres causes. Amb fletxa verda gens activats i en vermell gens reprimits per l'absència de Math6 (Cell Signaling technology).

Un altre gen interessant modulats de manera significativa pel shMath6 és el gen que codifica per *Mad2l2*. Se'n coneix molt poc del que fa aquesta proteïna, però es coneix que regula el complex APC-Cdc20. En complementació als estudis d'expressió gènica on observem canvis molt evidents ja a les 24 hores, els assajos de ChIP van revelar que Math6 s'uneix al promotor d'aquest factor, i que per tant guanya pes com a possible efector dels canvis que es produeixen amb la manca de Math6 en el model cel·lular de les mPAC. A més a més, aquesta diana de Math6 també es veu modificada significativament en un model de pèrdua de Math6 en la línia cel·lular α TC1.6 realitzat pel nostre grup, fet que indicaria que *Mad2l2* és una diana de Math6 en diferents contextos cel·lulars.

En quant als efectes de Neurog3 sobre el cycle cel·lular en el model cel·lular mPAC, hem observat una disminució de la proliferació i un petit augment de la població de cèl·lules en G0/G1. Tal i com estava descrit, l'expressió de Neurog3 produeix una disminució de marcadors de proliferació com el Ki67

[129]. No obstant, els *microarrays* han posat de manifest un fet inesperat, com Neurog3 estaria activant gens de les fases G1/S (dades no mostrades), és a dir, gens promotors de cicle, quan hom pensaria que hauria d'estar fent el contrari degut a la noció establerta de que aquests factor produeix una sortida de cicle. Aquest fet podria relacionar-se amb el que s'ha descrit recentment en altres teixits, on s'ha demostrat com determinats bHLHs són essencials en la proliferació de les cèl·lules progenitores anterior a la seva diferenciació terminal [169, 170]. En base a aquestes dades, aquesta seria una explicació a perquè Neurog3 està activant un possible promotor de cicle de forma tant ràpida com Math6.

Per conseqüent, la correcta expressió de Math6 en el model cel·lular emprat, és essencial per a que les cèl·lules proliferin i puguin progressar al llarg del cicle cel·lular amb normalitat. Per tant, aquests resultats requeririen la complementació amb dades obtingudes *in vivo* per verificar la seva validesa, ja que deriven d'estudis realitzats en una línia cel·lular immortalitzada, la qual de manera basal ja té alteracions en la proliferació entre altres característiques. Per aquesta raó, seria interessant realitzar estudis similars en cèl·lules primàries com per exemple les derivades d'illots pancreàtics adults.

De manera particularment important, emprant el model Kock-in GFP-Cre per Math6, hem pogut veure mitjançant l'estudi de la co-expressió de la proteïna GFP i Ki67 a e15.5, que la majoria de cèl·lules que expressen Math6 no es troben en un estat proliferatiu actiu, només un 18% de les cèl·lules GFP positives són també Ki67 positives, i la majoria es troben en els acins pancreàtics. A l'hora d'interpretar aquests resultats cal recordar que desconexem la vida mitja de la proteïna Math6 i que sabem que GFP té una vida mitja llarga i, per tant, és probable que no totes les cèl·lules GFP positives siguin un representatiu de l'expressió de Math6. A e15.5 la proporció de cèl·lules Neurog3/Ki67 positives és menor a l'1% de totes les cèl·lules Neurog3 positives. Un experiment essencial en la caracterització de les cèl·lules Math6 positives *in vivo*, però que no s'ha pogut realitzar per problemes tècnics, hagués estat la realització de la triple tinció per GFP(Math6)/Ki67/Neurog3, per veure si aquest 1% de cèl·lules doble positives per Neurog3 i Ki67 expressen també Math6, i d'aquesta manera obtenir un perfil més acurat de les cèl·lules derivades d'aquest tipus de progenitors endocrins.

En conjunt, Math6 sembla ser un regulador potencial del cicle cel·lular, i gràcies als assajos de *microarrays* d'expressió hem establert un grup de possibles dianes d'aquesta funció cel·lular. A més a més, hem identificat altres dianes potencials del shMath6 entre les quals destaca el remodelador de cromatina SetD7, on caldran estudis futurs per determinar els seu paper en la proliferació i progressió del cicle cel·lular. Però és evident la necessitat d'esbrinar la funció de Math6 en un

context *in vivo*, la qual s'ha intentat abordar amb la generació dels animals gen-anul·lats específics de pàncrees per Math6.

L'ELIMINACIÓ DE MATH6 AL PÀNCREES PRESENTA UN FENOTIP FEBLE

El present estudi ha demostrat que la deleció de Math6 del pàncrees no produeix cap efecte dramàtic sobre la formació i funcionalitat d'aquest òrgan a excepció d'un discret augment en la mida del pàncrees i una major àrea de cèl·lules Sst positives, ambdós efectes evidents al naixement. No obstant, aquesta alteració en el compartiment δ no resulta en cap afectació severa de l'homeòstasi de la glucosa en l'adultesa. Ja s'havien descrit prèviament escassos efectes reconeguts de la Sst sobre l'homeòstasi de la glucosa en animals KO complets per aquesta hormona [171].

A diferència de la letalitat temprana dels KO total de Math6 (knockin GFP-Cre), els resultats derivats de la caracterització del model específic de pàncrees han estat poc encoratjadors doncs la manca d'un fenotip marcat ens ha dificultat poder desxifrar la funció d'aquest factor *in vivo*. Quines poden ser les causes de que la pèrdua de Math6 des de l'inici del desenvolupament pancreàtic tingui un efecte tant dèbil? Tot i que la disminució de l'expressió de Math6 a e15.5 és del 77%, pot existir una **compensació parcial** de Math6 per l'expressió romanent d'ell mateix degut a l'expressió mosaic de la Pdx1-Cre i que aquestes cèl·lules tinguin una avantatge respecte les altres, o per un altre factor no identificat, o pel fons genètic d'aquests animals.

Un altra opció també molt probable és el fet que els processos de diferenciació estan altament regulats i per tant, puguin existir proteïnes que pugin realitzar la mateixa funció i compensin la pèrdua de Math6, ens referiríem a un nivell extra de regulació. Un dels exemples més interessants en la literatura és el cas del regulador de cicle Cdkn1a (p21), el qual tot i la seva rellevància no presenta defectes remarcables en la formació i funció dels illots [126], i per tant la seva absència es creu compensada per altres vies.

L'estudi d'aquest model animal sorgeix del fet de voler estudiar l'efecte del silenciament de Math6 durant el desenvolupament del pàncrees, degut a les evidències del seu possible rol en la cascada de diferenciació endocrina. El primer resultat observat en l'estudi d'aquest model animal és que l'eliminació de Math6 sembla afavorir el creixement del pàncrees. L'estudi de l'expressió de la Ph3 en primordis pancreàtics a e15.5 revela un augment discret d'aquest marcador, el qual desconexim si és suficient per explicar el petit augment observat en la grandària del pàncrees. Un altra possibilitat és que l'edat escollida per realitzar aquests anàlisis no sigui l'ídònia i que en altres edats observéssim canvis més importants en l'expressió de Ph3.

Pel que fa a la modulació dels gens de cicle en el model animal, observem en concordança a les dades observades *in vitro* una disminució en l'expressió del regulador de cicle Cdk1 a e15.5, i un augment de Mad2l2, en sentit contrari a les dades *in vitro*, canvis els quals per sí sols no aporten gaire informació, i per tant, serà necessari realitzar una anàlisi més profunda incloent altres reguladors de cicle i també els seus nivells proteics per treure alguna conclusió.

En els estudis *in vitro* de sobreexpressió de Math6 i Neurog3 de l'apartat 2.1.2. ja ens mostren una efecte negatiu de Math6 sobre l'expressió de Sst, aquest resultat es corrobora també *in vivo*, fet que indica com Math6 estaria regulant l'expressió d'aquesta hormona. No obstant, es coneix molt poc sobre aquest tipus cel·lular i els factors específics que regulen la seva diferenciació. Seria necessari comprovar si aquest augment de cèl·lules Sst positives es manté en l'etapa adulta, anàlisi actualment en curs a les 36 setmanes de vida. Encara que l'estudi de l'expressió gènica obtingut a partir d'illots aïllats indiquen que aquestes diferències no es mantenen en l'adultesa. Cal tenir present que durant la tècnica d'aïllament d'illots no s'obtenen la totalitat d'illots, podent perdre's els de menor mida, que podrien presentar unes característiques diferents als de major mida. A més, les cèl·lules α i δ són més susceptibles a malmetre's durant la manipulació dels illots, ja que es troben situades a la perifèria. Si finalment es confirmés que la quantitat de cèl·lules δ es van perdent amb l'edat, això podria suggerir que en els KO es produeix un procés de remodelació endocrina que compensa les alteracions que han tingut lloc durant l'organogènesi.

L'anàlisi de l'expressió gènica dels primordis pancreàtics de e14.5 o e15.5 ha exposat una possible alteració temporal de l'expressió d'alguns dels factors de transcripció que dirigeixen la diferenciació endocrina. Hi ha diversos factors l'expressió dels quals està disminuïda a e14.5 en el KO respecte el control, però aquesta diferència desapareix a e15.5, suggerint cert alentiment de l'activació del programa de diferenciació que queda compensat de manera molt ràpida. El retard observat en el pic de màxima expressió de *Neurog3* (control a e14.5 i KO a e15.5 (fig.84)), va acompanyat d'un retard en l'activació de *NeuroD1* i *Nkx6.1*, gens que participen en el manteniment i la continuació del programa de diferenciació endocrí, i d'una infra-expressió mantinguda de *Nkx2.2*. Tot i que seria plausible que l'alteració d'aquests gens originés deficiències importants en la formació dels illots, els únics canvis detectats són una disminució dels nivells de *Gck* i un augment de *Sst* a e15.5. Una pregunta que se'ns planteja és si l'augment d'expressió de *Sst* en el pàncrees en nous nats, podria ser degut a aquest retard en l'activació del programa de diferenciació endocrí, ja que els progenitors endocrins del ducte adquireixen la capacitat de diferenciar-se cap a cèl·lules δ a partir de e14.5 [172]. D'aquesta manera, es podria donar un increment de les cèl·lules *Sst* positives en els nostres animals KO ja que el pic de *Neurog3* no es produeix fins a una etapa en la que els progenitors estan més

determinats per diferenciar-se cap a cèl·lules δ . Per tant, estaríem front un retard en l'activació del programa de diferenciació endocrina i no d'un impediment, ja que els nivells d'expressió dels factors de determinació *Neurog3*, *NeuroD1* i *Nkx6.1* es recuperen a e15.5.

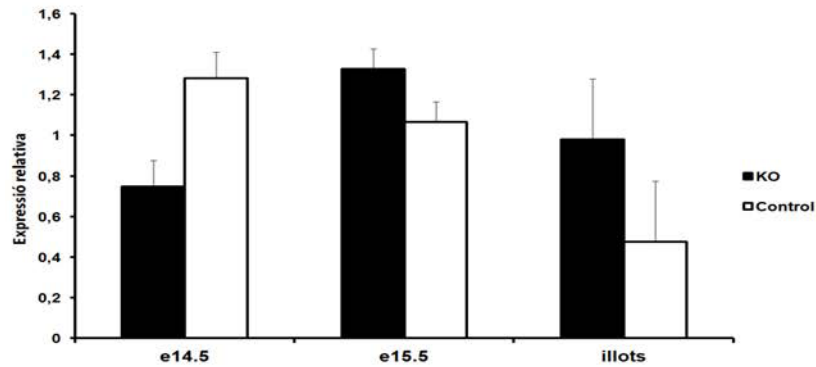


Figura 83. Expressió relativa del mRNA de *Neurog3* durant el desenvolupament en les etapes claus de la transició secundària en primordis pancreàtics, i en illots d'animals mascles adults de 36 setmanes. El pic de *Neurog3* es veu modificat en els animals KO específics de pàncrees per *Math6*. Expressió normalitzada per l'expressió de *Tbp*. Mitjana \pm Sem.

A més a més, l'estudi de l'expressió proteica de *Neurog3* a e15.5 corrobora un augment significatiu en comparació als animals control, indicant que *Math6* podria estar participant en la regulació de l'expressió de la pròpia *Neurog3 in vivo*. Estudis recents han connectat la regulació de l'expressió i activitat de *Neurog2* amb la seva fosforilació per *Cdk1* durant el desenvolupament neural [118]. Seria interessant esbrinar si la connexió entre *Math6* i el control del cicle cel·lular observat *in vitro*, es conserva *in vivo*, i si aquesta connexió està relacionada directament amb el control dels progenitors endocrins.

Per tant, els resultats obtinguts fins ara han demostrat que *Math6* no és un factor essencial per a la formació i funcionalitat del pàncrees endocrí. No obstant, els canvis subtils observats en els perfils d'expressió gènica (marcadors de diferenciació i gens de cicle), i àrea de *Sst*, indicarien que *Math6* sí que participaria en la diferenciació d'aquest compartiment. Caldrà veure si aquestes alteracions poden tenir impacte sobre la funció pancreàtica en situacions fisiopatològiques com l'obesitat o l'envelliment, o amb la combinació amb altres models genètics.

VI. RESUM I CONCLUSIONS

Caracterització bioquímica de Math6:

- Math6 per sí sol no activa la transcripció dependent de caixes E canòniques
- Math6 es pot unir a la proteïna E47, però la capacitat d'activació transcripcional dels heterodímers Math6/E47 és més feble que la dels homodímers E47/E47 o els heterodímers Neurog3/E47
- La recaptació d'E47 per part de Math6 és un possible mecanisme mitjançant el qual Math6 pot reprimir la transcripció
- Math6 té una activitat repressora transcripcional intrínseca quan es força la seva unió al DNA. El domini ric en prolines (PRR) és essencial per aquesta activitat repressora

Funció de Math6 en el model cel·lular de les mPAC:

- Math6 no té activitat pro-endocrina (indueix el programa de diferenciació) *in vitro*, a diferència dels factors Neurog3 o NeuroD1 amb els que comparteix gran homologia en el domini bHLH
- Math6 bloqueja l'activació en resposta a Neurog3 en determinats *locus* gènics. En tots els casos, el bloqueig requereix el domini bHLH de Math6
- El silenciament gènic de Math6 no afecta l'activació de gens de diferenciació endocrina. En canvi, si afecta l'expressió d'un nombre elevat de gens relacionats amb el cicle cel·lular
- L'absència de Math6 provoca una reducció de la proliferació i acumulació de cèl·lules en les fases G2/M. La dis-regulació del complex regulador Ccnb1/Cdk1 estaria implicat en aquest efecte

Model gen-anul·lat condicional de Math6 específic de pàncrees:

- L'eliminació de Math6 a l'epiteli pancreàtic embrionari no afecta la formació de l'òrgan. S'observa una tendència a major grandària del pàncrees al naixement. Tampoc té efectes obvis sobre la funció pancreàtica en l'adultesa
- L'eliminació de Math6 té efectes discrets sobre la diferenciació del compartiment endocrí, que s'evidencia per un discret però significatiu augment de l'àrea somatostatina positiva en el pàncrees neonatal
- La deleció de Math6 resulta en canvis en els perfils d'expressió a e14.5-15.5 de determinats factors de transcripció endocrins claus de la transició secundària. Els efectes observats suggereixen cert grau d'alentiment en l'activació del programa de diferenciació endocrina
- L'eliminació de Math6 durant el desenvolupament té un impacte sobre l'expressió d'alguns dels gens de cicle cel·lular identificats com a possibles dianes de Math6 en el model de les cèl·lules mPAC

Per tant, amb aquests resultats podem concloure que:

1. Math6 és un factor de transcripció bHLH que actua principalment com a repressor transcripcional i/o activador feble en funció del context cel·lular. Per tant, Math6 es situa funcionalment més proper a la família bHLH Tal1/Lyl1 que a la família Neurog3/NeuroD on es va classificar inicialment
2. En base a les dades obtingudes *in vitro* i *in vivo*, concloem que Math6 no té un paper essencial en l'establiment del programa d'expressió gènica endocrina depenent de Neurog3. En canvi, Math6 podria estar regulant el cicle cel·lular i d'aquesta manera intervenir a nivell de progenitors més joves, quan es dona la sortida de cicle necessària per a l'inici de la diferenciació. Estudis futurs hauran d'aprofundir en les bases moleculars de la relació entre el control del cicle cel·lular i el programa de diferenciació endocrina, i sobretot en les implicacions que aquesta relació pot tenir en la formació i funció de les cèl·lules endocrines del pàncrees

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Bouwens, L. and I. Rooman, *Regulation of pancreatic beta-cell mass*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(4): p. 1255-70.
2. van Belle, T.L., K.T. Coppieters, and M.G. von Herrath, *Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(1): p. 79-118.
3. Bergholdt, R., et al., *Type 1 diabetes mellitus: an inflammatory disease of the islet*. *Adv Exp Med Biol*, 2004. **552**: p. 129-53.
4. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 2012. **35 Suppl 1**: p. S64-71.
5. *Joslin's Diabetes Mellitus 14th Edition*, ed. M. C.R. Kahn, Gordon C. Weir, MD, Alan M. Jacobson, MD, Alan C. Moses, MD, and Robert J. Smith, MD 2005: Lippincott Williams & Wilkins.
6. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010. **87**(1): p. 4-14.
7. Shapiro, A.M., et al., *International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(13): p. 1318-30.
8. Yechoor, V. and L. Chan, *Minireview: beta-cell replacement therapy for diabetes in the 21st century: manipulation of cell fate by directed differentiation*. *Mol Endocrinol*, 2010. **24**(8): p. 1501-11.
9. Oliver-Krasinski, J.M. and D.A. Stoffers, *On the origin of the beta cell*. *Genes Dev*, 2008. **22**(15): p. 1998-2021.
10. Banerjee, M., M. Kanitkar, and R.R. Bhonde, *Approaches towards endogenous pancreatic regeneration*. *Rev Diabet Stud*, 2005. **2**(3): p. 165-76.
11. Zhou, Q., et al., *A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis*. *Dev Cell*, 2007. **13**(1): p. 103-14.
12. Kim, S.K. and R.J. MacDonald, *Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis*. *Curr Opin Genet Dev*, 2002. **12**(5): p. 540-7.
13. Jonsson, J., et al., *Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice*. *Nature*, 1994. **371**(6498): p. 606-9.
14. Offield, M.F., et al., *PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum*. *Development*, 1996. **122**(3): p. 983-95.
15. Stoffers, D.A., et al., *Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence*. *Nat Genet*, 1997. **15**(1): p. 106-10.
16. Ahlgren, U., et al., *beta-cell-specific inactivation of the mouse *lpf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes*. *Genes Dev*, 1998. **12**(12): p. 1763-8.
17. Burlison, J.S., et al., *Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells*. *Dev Biol*, 2008. **316**(1): p. 74-86.

18. Gittes, G.K., *Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review*. Dev Biol, 2009. **326**(1): p. 4-35.
19. Sellick, G.S., et al., *Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis*. Nat Genet, 2004. **36**(12): p. 1301-5.
20. Seymour, P.A. and M. Sander, *Historical perspective: beginnings of the beta-cell: current perspectives in beta-cell development*. Diabetes, 2011. **60**(2): p. 364-76.
21. Spence, J.R., et al., *Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells*. Dev Cell, 2009. **17**(1): p. 62-74.
22. Harrison, K.A., et al., *Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 71-5.
23. Li, H., et al., *Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 67-70.
24. Seymour, P.A., et al., *SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(6): p. 1865-70.
25. Jacquemin, P., F.P. Lemaigre, and G.G. Rousseau, *The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade*. Dev Biol, 2003. **258**(1): p. 105-16.
26. Lee, C.S., et al., *Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic alpha-cells*. Dev Biol, 2005. **278**(2): p. 484-95.
27. Haumaitre, C., et al., *Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1490-5.
28. Murtaugh, L.C., *Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible*. Development, 2007. **134**(3): p. 427-38.
29. Guney, M.A. and M. Gannon, *Pancreas cell fate*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2009. **87**(3): p. 232-48.
30. Jensen, J., et al., *Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation*. Diabetes, 2000. **49**(2): p. 163-76.
31. Jensen, J., *Gene regulatory factors in pancreatic development*. Dev Dyn, 2004. **229**(1): p. 176-200.
32. Gradwohl, G., et al., *neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1607-11.
33. Wang, S., et al., *Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9715-20.
34. Gasa, R., et al., *Induction of pancreatic islet cell differentiation by the neurogenin-neuroD cascade*. Differentiation, 2008. **76**(4): p. 381-91.

35. Huang, H.P., et al., *Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(9): p. 3292-307.
36. Naya, F.J., et al., *Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice*. Genes Dev, 1997. **11**(18): p. 2323-34.
37. Mellitzer, G., et al., *IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas*. EMBO J, 2006. **25**(6): p. 1344-52.
38. Gierl, M.S., et al., *The zinc-finger factor Insm1 (IA-1) is essential for the development of pancreatic beta cells and intestinal endocrine cells*. Genes Dev, 2006. **20**(17): p. 2465-78.
39. St-Onge, L., et al., *Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas*. Nature, 1997. **387**(6631): p. 406-9.
40. Sosa-Pineda, B., et al., *The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas*. Nature, 1997. **386**(6623): p. 399-402.
41. Collombat, P., et al., *Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development*. Genes Dev, 2003. **17**(20): p. 2591-603.
42. Collombat, P., et al., *Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 961-70.
43. Sussel, L., et al., *Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells*. Development, 1998. **125**(12): p. 2213-21.
44. Madsen, O.D., et al., *Transcription factors contributing to the pancreatic beta-cell phenotype*. Horm Metab Res, 1997. **29**(6): p. 265-70.
45. Puri, S. and M. Hebrok, *Cellular plasticity within the pancreas--lessons learned from development*. Dev Cell, 2010. **18**(3): p. 342-56.
46. Jiang, F.X. and L.C. Harrison, *Extracellular signals and pancreatic beta-cell development: a brief review*. Mol Med, 2002. **8**(12): p. 763-70.
47. Guo, T. and M. Hebrok, *Stem cells to pancreatic beta-cells: new sources for diabetes cell therapy*. Endocr Rev, 2009. **30**(3): p. 214-27.
48. Hebrok, M., et al., *Regulation of pancreas development by hedgehog signaling*. Development, 2000. **127**(22): p. 4905-13.
49. Pulkkinen, M.A., et al., *The IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 is required for proper growth and branching of pancreatic ductal epithelium but not for differentiation of exocrine or endocrine cells*. Mech Dev, 2003. **120**(2): p. 167-75.
50. Georgia, S., et al., *p57 and Hes1 coordinate cell cycle exit with self-renewal of pancreatic progenitors*. Dev Biol, 2006. **298**(1): p. 22-31.
51. Apelqvist, A., et al., *Notch signalling controls pancreatic cell differentiation*. Nature, 1999. **400**(6747): p. 877-81.

52. Lee, J.C., et al., *Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3*. Diabetes, 2001. **50**(5): p. 928-36.
53. Esni, F., et al., *Notch inhibits Ptf1 function and acinar cell differentiation in developing mouse and zebrafish pancreas*. Development, 2004. **131**(17): p. 4213-24.
54. Jonckheere, N., et al., *Analysis of mPygo2 mutant mice suggests a requirement for mesenchymal Wnt signaling in pancreatic growth and differentiation*. Dev Biol, 2008. **318**(2): p. 224-35.
55. Ahnfelt-Ronne, J., et al., *Mesenchymal bone morphogenetic protein signaling is required for normal pancreas development*. Diabetes, 2010. **59**(8): p. 1948-56.
56. Gasa, R.a.S., A, *Transcriptional control of pancreatic development: bHLH factors at the crossroad of exocrine and endocrine specification and differentiation*. Trends in Developmental Biology, 2010. **5**: p. 29-49.
57. Stevens, J.D., E.H. Roalson, and M.K. Skinner, *Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation*. Differentiation, 2008. **76**(9): p. 1006-22.
58. Massari, M.E. and C. Murre, *Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(2): p. 429-40.
59. Grandori, C., et al., *The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 653-99.
60. Kewley, R.J., M.L. Whitelaw, and A. Chapman-Smith, *The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(2): p. 189-204.
61. Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamamori, *HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway*. J Cell Physiol, 2003. **194**(3): p. 237-55.
62. Dubois, L. and A. Vincent, *The COE--Collier/Olf1/EBF--transcription factors: structural conservation and diversity of developmental functions*. Mech Dev, 2001. **108**(1-2): p. 3-12.
63. Mellitzer, G., et al., *Pancreatic islet progenitor cells in neurogenin 3-yellow fluorescent protein knock-add-on mice*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(11): p. 2765-76.
64. Wang, J., et al., *Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea*. N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 270-80.
65. Pinney, S.E., et al., *Neonatal diabetes and congenital malabsorptive diarrhea attributable to a novel mutation in the human neurogenin-3 gene coding sequence*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(7): p. 1960-5.
66. Rubio-Cabezas, O., et al., *Permanent Neonatal Diabetes and Enteric Anendocrinosis Associated With Biallelic Mutations in NEUROG3*. Diabetes, 2011. **60**(4): p. 1349-53.
67. Grapin-Botton, A., A.R. Majithia, and D.A. Melton, *Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes*. Genes Dev, 2001. **15**(4): p. 444-54.

68. Yechoor, V., et al., *Gene therapy with neurogenin 3 and betacellulin reverses major metabolic problems in insulin-deficient diabetic mice*. *Endocrinology*, 2009. **150**(11): p. 4863-73.
69. Gasa, R., et al., *Proendocrine genes coordinate the pancreatic islet differentiation program in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(36): p. 13245-50.
70. Serafimidis, I., et al., *Novel effectors of directed and Ngn3-mediated differentiation of mouse embryonic stem cells into endocrine pancreas progenitors*. *Stem Cells*, 2008. **26**(1): p. 3-16.
71. Jenny, M., et al., *Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium*. *EMBO J*, 2002. **21**(23): p. 6338-47.
72. Petri, A., et al., *The effect of neurogenin3 deficiency on pancreatic gene expression in embryonic mice*. *J Mol Endocrinol*, 2006. **37**(2): p. 301-16.
73. Rukstalis, J.M. and J.F. Habener, *Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration*. *Islets*, 2009. **1**(3): p. 177-84.
74. Wang, S., et al., *Neurog3 gene dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas*. *Dev Biol*, 2010. **339**(1): p. 26-37.
75. Villasenor, A., D.C. Chong, and O. Cleaver, *Biphasic Ngn3 expression in the developing pancreas*. *Dev Dyn*, 2008. **237**(11): p. 3270-9.
76. Kanadia, R.N. and C.L. Cepko, *Alternative splicing produces high levels of noncoding isoforms of bHLH transcription factors during development*. *Genes Dev*, 2010. **24**(3): p. 229-34.
77. Vosper, J.M., et al., *Regulation of neurogenin stability by ubiquitin-mediated proteolysis*. *Biochem J*, 2007. **407**(2): p. 277-84.
78. Malecki, M.T., et al., *Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus*. *Nat Genet*, 1999. **23**(3): p. 323-8.
79. Rubio-Cabezas, O., et al., *Homozygous mutations in NEUROD1 are responsible for a novel syndrome of permanent neonatal diabetes and neurological abnormalities*. *Diabetes*, 2010. **59**(9): p. 2326-31.
80. Heremans, Y., et al., *Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3*. *J Cell Biol*, 2002. **159**(2): p. 303-12.
81. Schwitzgebel, V.M., et al., *Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas*. *Development*, 2000. **127**(16): p. 3533-42.
82. Kojima, H., et al., *NeuroD-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice*. *Nat Med*, 2003. **9**(5): p. 596-603.
83. Brentrup, D., et al., *Regulation of Drosophila wing vein patterning: net encodes a bHLH protein repressing rhomboid and is repressed by rhomboid-dependent Egfr signalling*. *Development*, 2000. **127**(21): p. 4729-41.
84. Chang, H.C., et al., *Modeling spinal muscular atrophy in Drosophila*. *PLoS One*, 2008. **3**(9): p. e3209.

85. Inoue, C., et al., *Math6, a bHLH gene expressed in the developing nervous system, regulates neuronal versus glial differentiation*. Genes Cells, 2001. **6**(11): p. 977-86.
86. Ross, M.D., et al., *Math6 expression during kidney development and altered expression in a mouse model of glomerulosclerosis*. Dev Dyn, 2006. **235**(11): p. 3102-9.
87. Lynn, F.C., et al., *Identification of the bHLH factor Math6 as a novel component of the embryonic pancreas transcriptional network*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2430.
88. Yao, J., et al., *Atoh8, a bHLH transcription factor, is required for the development of retina and skeletal muscle in zebrafish*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e10945.
89. Kautz, L., et al., *Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1503-9.
90. Kubo, F. and S. Nakagawa, *Cath6, a bHLH atonal family proneural gene, negatively regulates neuronal differentiation in the retina*. Dev Dyn, 2010. **239**(9): p. 2492-500.
91. Pujadas, G., et al., *Sequence and epigenetic determinants in the regulation of the Math6 gene by Neurogenin3*. Differentiation, 2011. **82**(2): p. 66-76.
92. Evans, T., et al., *Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division*. Cell, 1983. **33**(2): p. 389-96.
93. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Mammalian cyclin-dependent kinases*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(11): p. 630-41.
94. Morgan, D.O., *Principles of CDK regulation*. Nature, 1995. **374**(6518): p. 131-4.
95. Murray, A.W., *Recycling the cell cycle: cyclins revisited*. Cell, 2004. **116**(2): p. 221-34.
96. Jeffrey, P.D., et al., *Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex*. Nature, 1995. **376**(6538): p. 313-20.
97. Obaya, A.J. and J.M. Sedivy, *Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(1): p. 126-42.
98. Poon, R.Y. and T. Hunter, *Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin*. Science, 1995. **270**(5233): p. 90-3.
99. Morgan, D.O., *Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 261-91.
100. Nilsson, I. and I. Hoffmann, *Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family*. Prog Cell Cycle Res, 2000. **4**: p. 107-14.
101. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 704-7.
102. Hannon, G.J. and D. Beach, *p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest*. Nature, 1994. **371**(6494): p. 257-61.
103. Guan, K.L., et al., *Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function*. Genes Dev, 1994. **8**(24): p. 2939-52.

104. Xiong, Y., et al., *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 701-4.
105. Polyak, K., et al., *p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest*. Genes Dev, 1994. **8**(1): p. 9-22.
106. Hatada, I. and T. Mukai, *Genomic imprinting of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse*. Nat Genet, 1995. **11**(2): p. 204-6.
107. Nakayama, K.I. and K. Nakayama, *Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 369-81.
108. Lyapina, S.A., et al., *Human CUL1 forms an evolutionarily conserved ubiquitin ligase complex (SCF) with SKP1 and an F-box protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7451-6.
109. Schulman, B.A., et al., *Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 381-6.
110. Peters, J.M., *SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(6): p. 759-68.
111. Geley, S., et al., *Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint*. J Cell Biol, 2001. **153**(1): p. 137-48.
112. Hartwell, L.H. and T.A. Weinert, *Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events*. Science, 1989. **246**(4930): p. 629-34.
113. Hartwell, L.H. and M.B. Kastan, *Cell cycle control and cancer*. Science, 1994. **266**(5192): p. 1821-8.
114. Wildwater, M., I. The, and S. van den Heuvel, *Coordination of cell proliferation and differentiation: finding a GEM in the root?* Dev Cell, 2007. **12**(6): p. 841-2.
115. Coffman, J.A., *Cell cycle development*. Dev Cell, 2004. **6**(3): p. 321-7.
116. Buttitta, L.A. and B.A. Edgar, *Mechanisms controlling cell cycle exit upon terminal differentiation*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(6): p. 697-704.
117. Halevy, O., et al., *Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD*. Science, 1995. **267**(5200): p. 1018-21.
118. Ali, F., et al., *Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis*. Development, 2011. **138**(19): p. 4267-77.
119. Fajas, L., et al., *Impaired pancreatic growth, beta cell mass, and beta cell function in E2F1 (-/-) mice*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1288-95.
120. Iglesias, A., et al., *Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1/E2F2 double-mutant mice*. J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1398-407.

121. Cozar-Castellano, I., et al., *Induction of beta-cell proliferation and retinoblastoma protein phosphorylation in rat and human islets using adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase-4 and cyclin D1*. Diabetes, 2004. **53**(1): p. 149-59.
122. Harvey, M., et al., *Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine origin*. Cancer Res, 1995. **55**(5): p. 1146-51.
123. Rane, S.G., et al., *Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia*. Nat Genet, 1999. **22**(1): p. 44-52.
124. Georgia, S. and A. Bhushan, *Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass*. J Clin Invest, 2004. **114**(7): p. 963-8.
125. Kushner, J.A., et al., *Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(9): p. 3752-62.
126. Cozar-Castellano, I., M. Haught, and A.F. Stewart, *The cell cycle inhibitory protein p21cip is not essential for maintaining beta-cell cycle arrest or beta-cell function in vivo*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3271-8.
127. Karnik, S.K., et al., *Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14659-64.
128. Gu, G., J. Dubauskaite, and D.A. Melton, *Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors*. Development, 2002. **129**(10): p. 2447-57.
129. Desgraz, R. and P.L. Herrera, *Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors*. Development, 2009. **136**(21): p. 3567-74.
130. Miyatsuka, T., et al., *Neurogenin3 inhibits proliferation in endocrine progenitors by inducing Cdkn1a*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(1): p. 185-90.
131. Kim, S.Y. and S.G. Rane, *The Cdk4-E2f1 pathway regulates early pancreas development by targeting Pdx1+ progenitors and Ngn3+ endocrine precursors*. Development, 2011. **138**(10): p. 1903-12.
132. Haumaitre, C., O. Lenoir, and R. Scharfmann, *Histone deacetylase inhibitors modify pancreatic cell fate determination and amplify endocrine progenitors*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(20): p. 6373-83.
133. Irizarry, R.A., et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. Biostatistics, 2003. **4**(2): p. 249-64.
134. Gautier, L., et al., *affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level*. Bioinformatics, 2004. **20**(3): p. 307-15.
135. Johnson, W.E., C. Li, and A. Rabinovic, *Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods*. Biostatistics, 2007. **8**(1): p. 118-27.
136. Smyth, G.K., *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. Stat Appl Genet Mol Biol, 2004. **3**: p. Article3.

137. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.
138. Davis, R.L. and D.L. Turner, *Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning*. Oncogene, 2001. **20**(58): p. 8342-57.
139. Zilfou, J.T., et al., *The corepressor mSin3a interacts with the proline-rich domain of p53 and protects p53 from proteasome-mediated degradation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3974-85.
140. Soufi, A., et al., *Oligomerisation of the developmental regulator proline rich homeodomain (PRH/Hex) is mediated by a novel proline-rich dimerisation domain*. J Mol Biol, 2006. **358**(4): p. 943-62.
141. Hoffman, B.G., et al., *Identification of transcripts with enriched expression in the developing and adult pancreas*. Genome Biol, 2008. **9**(6): p. R99.
142. White, S.A. and D.W. Manas, *Pancreas transplantation*. Ann R Coll Surg Engl, 2008. **90**(5): p. 368-70.
143. Ban, R., T. Nishida, and T. Urano, *Mitotic kinase Aurora-B is regulated by SUMO-2/3 conjugation/deconjugation during mitosis*. Genes Cells, 2011. **16**(6): p. 652-69.
144. Mishra, A., S.K. Godavarthi, and N.R. Jana, *UBE3A/E6-AP regulates cell proliferation by promoting proteasomal degradation of p27*. Neurobiol Dis, 2009. **36**(1): p. 26-34.
145. Trembley, J.H., et al., *Differential regulation of cyclin B1 RNA and protein expression during hepatocyte growth in vivo*. Cell Growth Differ, 1996. **7**(7): p. 903-16.
146. Kim, K.C., et al., *Cyclin B1 expression regulated by cytoplasmic polyadenylation element binding protein in astrocytes*. J Neurosci, 2011. **31**(34): p. 12118-28.
147. Carr, S.M. and N.B. La Thangue, *Cell cycle control by a methylation-phosphorylation switch*. Cell Cycle, 2011. **10**(5): p. 733-4.
148. Taylor, W.R. and G.R. Stark, *Regulation of the G2/M transition by p53*. Oncogene, 2001. **20**(15): p. 1803-15.
149. Liu, P., N.A. Jenkins, and N.G. Copeland, *A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations*. Genome Res, 2003. **13**(3): p. 476-84.
150. Srinivas, S., et al., *Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus*. BMC Dev Biol, 2001. **1**: p. 4.
151. Gannon, M., P.L. Herrera, and C.V. Wright, *Mosaic Cre-mediated recombination in pancreas using the pdx-1 enhancer/promoter*. Genesis, 2000. **26**(2): p. 143-4.
152. D'Amour, K.A., et al., *Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(11): p. 1392-401.

153. Cho, Y.M., et al., *Betacellulin and nicotinamide sustain PDX1 expression and induce pancreatic beta-cell differentiation in human embryonic stem cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **366**(1): p. 129-34.
154. Ledent, V., O. Paquet, and M. Vervoort, *Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins*. *Genome Biol*, 2002. **3**(6): p. RESEARCH0030.
155. Murphy, M., et al., *Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a*. *Genes Dev*, 1999. **13**(19): p. 2490-501.
156. Lecuyer, E. and T. Hoang, *SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia*. *Exp Hematol*, 2004. **32**(1): p. 11-24.
157. Liu, Y., et al., *Structural basis for recognition of SMRT/N-CoR by the MYND domain and its contribution to AML1/ETO's activity*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(6): p. 483-97.
158. Kumar, R., et al., *CBFA2T3-ZNF652 corepressor complex regulates transcription of the E-box gene HEB*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(27): p. 19026-38.
159. Goardon, N., et al., *ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis*. *EMBO J*, 2006. **25**(2): p. 357-66.
160. Brzezinski, J.A.t., L. Prasov, and T. Glaser, *Math5 defines the ganglion cell competence state in a subpopulation of retinal progenitor cells exiting the cell cycle*. *Dev Biol*, 2012. **365**(2): p. 395-413.
161. Risebro, C.A., et al., *Hand1 regulates cardiomyocyte proliferation versus differentiation in the developing heart*. *Development*, 2006. **133**(22): p. 4595-606.
162. Mastroiannopoulos, N.P., et al., *Down-regulation of myogenin can reverse terminal muscle cell differentiation*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e29896.
163. Lenoir, O., et al., *Specific control of pancreatic endocrine beta- and delta-cell mass by class IIa histone deacetylases HDAC4, HDAC5, and HDAC9*. *Diabetes*, 2011. **60**(11): p. 2861-71.
164. Zhang, H., et al., *The FoxM1 transcription factor is required to maintain pancreatic beta-cell mass*. *Mol Endocrinol*, 2006. **20**(8): p. 1853-66.
165. Gavet, O. and J. Pines, *Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis*. *Dev Cell*, 2010. **18**(4): p. 533-43.
166. Gavet, O. and J. Pines, *Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis*. *J Cell Biol*, 2010. **189**(2): p. 247-59.
167. Liu, Y., et al., *Basic helix-loop-helix proteins bind to TrkB and p21(Cip1) promoters linking differentiation and cell cycle arrest in neuroblastoma cells*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(7): p. 2662-72.
168. Mutoh, H., et al., *The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells*. *Genes Dev*, 1998. **12**(6): p. 820-30.

169. Castro, D.S., et al., *A novel function of the proneural factor Ascl1 in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets*. Genes Dev, 2011. **25**(9): p. 930-45.
170. Zhang, K., J. Sha, and M.L. Harter, *Activation of Cdc6 by MyoD is associated with the expansion of quiescent myogenic satellite cells*. J Cell Biol, 2010. **188**(1): p. 39-48.
171. Hauge-Evans, A.C., et al., *Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function*. Diabetes, 2009. **58**(2): p. 403-11.
172. Johansson, K.A., et al., *Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types*. Dev Cell, 2007. **12**(3): p. 457-65.

ANNEX

Annex1. Llistat d'encebadors utilitzats

Gen	Seqüència	Aplicació
Cre	5' CCCCAGAAATGCCAGATTACG 3' CGTAGAGAGTCCGCGAGCCA	Genotipatge
Math6-LoxP	5' ATTGGAGGAAGGCTCGGTGAA 3' TTGGCATTCTGCTGCTGTC	Genotipatge
Math6 268-306 pb (encebadors P1 i P2)	5'AGCGTCCTTTGGGTAGATATATTCAACAC 3'ATTGGAGGAAGGCTCGGTGAA	Recombinació en pàncrees
Math6 53-223 pb (control: encebadors P3 i P4)	5'AAGAAGTGAACGGCCTCAAGAAGC 3'GATCGGGAACGGTTGTGTCC	Recombinació en pàncrees
PM2-Math6 1-232aa	5'TAGTCGACATGAAGCACATCCCGTCTC 3' GACAAGCTTCCGGTCTGCTGCAGGGCT	Creació vector
PM2-Math6 1-115aa	5'TAGTCGACATGAAGCACATCCCGTCTC 3' GACAAGCTTAGCGAAACCGCTTTGCG	Creació vector
PM2-Math6 116- 322aa	5' TAAGTCGACCTGGGCACAGTGGGACCG 3' GACAAGCTTTCACTCCTTCCGTTTCTTGGC	Creació vector
PM2-Math6 116- 232aa	5' TAAGTCGACCTGGGCACAGTGGGACCG 3' GACAAGCTTCCGGTCTGCTGCAGGGCT	Creació vector
PM2-Math6 230- 289aa	5' TAAGTCGACCAGACCCGGAGGCTTCTG 3'GACAAGCTTCAGGTCAGCCAGCCGTGC	Creació vector
PM2-Math6 230- 322aa	5' TAAGTCGACCAGACCCGGAGGCTTCTG 3' GACAAGCTTTCACTCCTTCCGTTTCTTGGC	Creació vector
PM2-Math6DBasic	5' TAGTCGACATGAAGCACATCCCGTCTC 3'GTATAAGCTTGATGGTGTGCACCCGCGTCCG 5'GACAAGCTTTCCTACTCGTCAATTTACAC 3' GCTCTAGATCACTCCTTCCGTTTCTTGGC	Creació vector
PM2-Math6DHLH	5'TAGTCGACATGAAGCACATCCCGTCTC 3'GTATAAGCTTGATGGTGTGCACCCGCGTCCG 5'GACAAGCTTGCCCTGCAGCAGACC 3' GCTCTAGATCACTCCTTCCGTTTCTTGGC	Creació vector
PM2-Math6DbHLH	5'TAGTCGACATGAAGCACATCCCGTCTC 3'GTATAAGCTTGATGGTGTGCACCCGCGTCCG 5'GACAAGCTTTCCTACTCGTCAATTTACAC 3' GCTCTAGATCACTCCTTCCGTTTCTTGGC	Creació vector
PM3-E47	5' GCGAATTCGGATGATGAACAGTCTCAGA 3'CGGAAGCTTTGTGGCCTCACC	Creació vector
PM3-Neurog3	5'TAACGCGTGGATCCGCCACCATGGATTACAAGGATGAC 3'TAACGCGTGGATCCGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGAT AAG	Creació vector
Promotor actina	5'AACAAGAGGCCACACAAATAGG 3'ACCCTCTGGGTGTGGATGTC	Chip
Promotor Mad2l2	5CGTTGACGCTGGACTAGCAG' 3CAAGGAACGAGCTAAACCGCC'	Chip
Promotor Cdk1	5'TACCACGCCAGCTAATAAC 3'CAACTGACTCTTGAGCTCTG	Chip
Promotor Cdkn1a	5'AGGAGGAAGACTGGGCATGT 3'CTGCTTTGGAGAAGCTGTGAG	Chip
Neurog3	5'TTCTCATCGGTACCCTTGCTG 3'GCAGACTCACCAGGAAGTATGG	qPCR
Sst	5'ACCCAGACTCCGTCAGTTTC 3'ATCATTCTCTGTCTGGTTGGGC	qPCR

Acs16	5' GTAAAGTGGGCACAGAGCAGTTCG 3' TGGGCCCAGGGTGTCTAGAG	qPCR
Pcsk1	5' AGTTGGAGGCATAAGAATGCTG 3' GCCTTCTGGGCTAGTCTGC	qPCR
Slc38a5	5' GAGACAGAAAAGGGCAGACG 3' TCTTTGGTTCCTGCATTTC	qPCR
Rab3c	5' GAACAGCTCGGGTTTGAGTTT 3' CTCCAAGCTCTCTGACATTTGT'	qPCR
Miat	5' TGTCTGTTCCATGTTGTTCTGCTG 3' CCGTAATTGTGGCTGGACCCAT	qPCR
Coro2b	5' TTGGGTAGAGGAGATGTGGG 3' GAAATCTCACCTCAGCTCGC	qPCR
Tubb3	5' TAGACCCCAGCGGCAACTAT 3' GTTCCAGGTTCCAAGTCCACC	qPCR
Pdx1	5' CCCAGTTTACAAGCTCGCT 3' CTCGGTTCCATTCGGGAAAGG	qPCR
NEUROG3	5' ACTTGCGGACCAGAAGCCCG 3' CGCTCCGTCTACGGGTCAC	qPCR
Math6	5' AGCCAAGAAACGGAAGGAGTG 3' TCTGGCAGCATCTTGAGGAAG	qPCR
Pax4	5' GAGTACCCTGCTTTTTGCC 3' ACTCGATTGATAGAGGACACACT	qPCR
NeuroD1	5' GGATCAATCTTCTTCCGGTG 3' TGCGAATGGCTATCGAAAGAC	qPCR
Nkx2.2	5' GAACAGCAAGCTAGCCGAGG 3' CGATCAGTCCATATAAGGCTGG	qPCR
Nkx6.1	5' TGGACAGCAAATCTTCGCCCTG 3' TGTTGTAATCGTCGTCATCCTC	qPCR
IA1	5' CTGGCGGCGTATCCGAATC 3' CCTGGCGACGGAACCTTCTT	qPCR
IAPP	5' TTTGAGAAGCAATGGGCATCC 3' CGTTCTTAAACCTGTGCCACT	qPCR
Cdk1	5' CAGAGAGGGTCCGTCGTAACC 3' ACTGGGCACTCCTTCTTCTCG	qPCR
Ccnb1	5' ATTTTGGAGGAGCCATGGC 3' CAGTTCTCGGTCTCAGCC	qPCR
Mad2l2	5' CTCTATGTGCGCGAGGTCTAC 3' CACTGGGCGGTGTTCTTAT	qPCR
Cdc20	5' GGTTTGTGTTCCGGGAGAGCTG 3' AAAGGCGACCAAGCGCGATC	qPCR
Bub1b	5' GCGTTTCCCTTGCCAGTT 3' TCGCGACACTCGAGACTGGA	qPCR
Cdkn1a	5' CCTGGTGATGTCCGACCTG 3' CCATGAGCGCATCGCAATC	qPCR
E2F7	5' ACACAGCAGTGCCTCCAGCA 3' TGTCCGCTTGACCATTCTGC	qPCR
SetD7	5' AAGAGGTTGACAGCAGGGATTGG 3' AGGAGGCACAGTACTTGGACACG	qPCR
Ins	5' AGCGTGCTTCTTCTACACACC 3' CCAGCTCCAGTTGTGCCACT	qPCR
Glc	5' AGGAATTCATTGCGTGGCTG 3' CAATGGCGACTTCTTCTGGG	qPCR
Arx	5' TTCCAGAAGACGCACTACCC 3' TCTGTCAGGTCCAGCCTCAT	qPCR
Amy	5'TGGCGTCAAATCAGGAACATG 3'AAAGTGGCTGACAAAGCCAG	qPCR

Ptf1a	5'ACAAGCCGCTAATGTGCGAGA 3TTGGAGAGGGCGCTTTTCGT'	qPCR
Mist1	5' GCTGACCGCCACCATACTTAC 3' TGTGTAGAGTAGCGTTGCAGG	qPCR
Bambi	5' GATCGCCACTCCAGCTACTTC 3' GCAGGCACTAAGCTCAGACTT	qPCR
Ki67	5'CAGCTCCTGCCTGTTTGAA 3'TTGCCTCTTGCTCTTTGACTTCA	qPCR
Gck	5'TGAAGCTGGAGACCCATCAGGA 3'AGCATCTCGGAGAAGTCCCACG	qPCR
Actb	5' AAATCGCTCCTGTCGAGTCGCG 3' ACGACCAGCGCAGCGATATCG	qPCR
Tbp	5' ACCCTTACCAATGACTCCTATG 3' ATGATGACTGCAGCAAATCGC	qPCR

Annex 2. Llistat d'anticossos primaris utilitzats

<u>Anticòs</u>	<u>Espècie</u>	<u>Aplicació</u>	<u>Dilució</u>	<u>Casa comercial</u>	<u>Referència</u>
beta-actina	conill	<i>western blot</i>	1/1000	Sigma-Aldrich	A-2066
HA	ratolí	western-blot	1/1000	Sigma-Aldrich	H-9658
Myc	ratolí	western-blot/chip/immunocitoquímica	1/1000	Millipore	05-419
FLAG	ratolí	Western-blot	1/1000	Sigma-Aldrich	F1804
Ins	conill d'índies	immunofluorescència	1/1000	DAKO	A0564
Glc	ratolí	immunofluorescència	1/1000	Sigma-Aldrich	G-2654
Sst	conill	immunofluorescència	1/250	DAKO	A0566
Ki67	ratolí	immunofluorescència	1/50	BD Pharmigen	556027
Ph3	conill	Immunofluorescència/FACS	1/1000	Millipore	06-570
IgG	ratolí	Chip	1/3000	Sigma-Aldrich	M5284
Gal4	ratolí	western-blot	1/500	Clontech	630403
Math6	conill	western-blot	1/500	Sigma-Aldrich	SAB3500026
Cleaved Caspase 3	conill	western-blot	1/1000	Cell Signaling	9662
Ccnb1	ratolí	western-blot	1/200	Santa Cruz	Sc-245
Cdk1	ratolí	western-blot	1/1000	Santa Cruz	Sc-54
GFP	conill	immunofluorescència	1/500	MBL	598
Pdx1	conill d'índies	immunofluorescència	1/500	ABCAM	ab47308
Neurog3	ratolí	immunofluorescència	1/500	BCBC	1F25A1B3

Annex 3. Llistat d'adenoviurs utilitzats

Adenoviurs	Espècie
Ad.CMV-NEUROG3	Humà
Ad.CMV-myc-Math6	Ratolí
Ad.CMV-shMath6	Ratolí
Ad.CMV-shControl	Ratolí
Ad.CMV-Math6 1-232aa	Ratolí (Creat durant la tesi)
Ad.CMV-Math6 Δ Basic	Ratolí (Creat durant la tesi)

Annex 4. Llistat de vectors d'expressió utilitzats

Vector	Ús	Origen
PM2	Assaig luciferasa	Clontech
PM2-Math6	Assaig luciferasa	Creat al nostre laboratori
pRL-CMV	Assaig luciferasa	Promega
pCMV.Tnt	Assaig luciferasa	Promega
pG5FLpro	Assaig luciferasa	Cedit pel laboratori Dr.German
pG5FLE1b	Assaig luciferasa	Cedit pel laboratori Dr.German
E1X3-TATA	Assaig luciferasa	Cedit pel laboratori Dra.Kroll
PM3-E47	Assaig luciferasa	Creat durant la tesi
PM3-Neurog3	Assaig luciferasa	Creat durant la tesi
pCMV.Tnt-FLAG-Neurog3	Assaig luciferasa	Creat al nostre laboratori
pCMV.Tnt-myc-Math6	Assaig luciferasa	Creat al nostre laboratori
pCMV.Tnt-HA-E47	Assaig luciferasa	Creat al nostre laboratori
pCMV.Tnt-Mash1	Assaig luciferasa	Creat al nostre laboratori
pCMV.Tnt-NeuroD1	Assaig luciferasa	Cedit pel laboratori Dr.German
PM2-Math6 1-232aa	Assaig luciferasa	Creat durant la tesi
PM2-Math6 1-115aa	Assaig luciferasa	Creat durant la tesi
PM2-Math6 116-322aa	Assaig luciferasa	Creat durant la tesi
PM2-Math6 116-232aa	Assaig luciferasa	Creat durant la tesi
PM2-Math6 230-289aa	Assaig luciferasa	Creat durant la tesi
PM2-Math6 230-322aa	Assaig luciferasa	Creat durant la tesi
PM2-Math6 Δ Basic	Assaig luciferasa	Creat durant la tesi
PM2-Math6 Δ HLH	Assaig luciferasa	Creat durant la tesi
PM2-Math6 Δ bHLH	Assaig luciferasa	Creat durant la tesi
PM2.Rb1p	Assaig luciferasa	Cedit pel laboratori Dr.Postigo
PM2-p300	Assaig luciferasa	Cedit pel laboratori Dr.Postigo

