

Tesi doctoral presentada per En/Na

Anna ROSANAS URGELL

amb el títol

**"Anàlisi de l'expressió dels gens ParaHox al
pàncrees endocrí"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 3 de desembre de 2004.

Facultat de Biologia
Departament de Genètica



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Índex

Introducció

1-54

1. DUPLICACIONS GÈNIQUES	3
1.1. Els gens homeòtics	3
1.2. Les duplicacions gèniques	4
1.3. Grans duplicacions genòmiques al llinatge dels cordats	4
1.4. Història evolutiva de la superfamília Hox	5
1.5. Homologia funcional o redundància	7
1.6. Per què mantenir un <i>cluster</i> ?	8
2. ELS GENS DEL CLUSTER PARAHOX	9
2.1. Els gens Cdx	9
2.1.1. Patró d'expressió dels gens Cdx en l'embrió de ratolí	10
2.1.2. Els gens Cdx i el patró de l'eix anteroposterior	12
2.1.3. Especificitat o redundància funcional?	13
2.1.4. El patró vertebral i les senyals reguladores de Cdx	13
2.1.5. <i>Cdx1</i> i <i>Cdx2/3</i> en intestí	15
2.2. Els Gsh	16
2.2.1. El gen <i>Gsh1</i>	16
2.2.2. El gen <i>Gsh2</i>	17
2.3. El gen <i>Pdx1</i>	18
2.3.1. Regulació del gen <i>Pdx1</i>	18
2.3.2. Diabetis mellitus	23
3. EL PÀNCREES	26
3.1. Senyalització en l'especificació del pàncrees presumptiu	27
3.2. Factors de transcripció i desenvolupament pancreàtic primerenc	30
3.3. Senyalització en l'especificació dels compartiments exocrí i endocrí	31
3.4. Diferenciació de les cèl.lules endocrines	33
3.5. Factors de transcripció que intervenen a la diferenciació de les cèl.lules dels illots	34
3.6. Diferenciació de les cèl.lules acinars exocrines	36
3.7. Els models de diferenciació endocrina	37
3.8. La plasticitat cel.lular	38
3.9. Desenvolupament pancreàtic postnatal	39
3.9.1. La replicació	39
3.9.2. La neogènesi	40
4. GENS REGULATS PER PDX1 EN ELS ILLOTS PANCREÀTICS	42
4.1. Regulació de la transcripció del gen de la insulina	42
4.1.1. Expressió específica a cèl.lula β	□□
4.1.2. Elements del promotor de la regulació positiva	43
4.1.3. Elements del promotor de regulació negativa	47
4.1.4. Especificitat del complex de transcripció	48
4.1.5. Efectes hormonals i de la nutrició sobre l'expressió del gen de la insulina	49
4.2. Regulació de la transcripció del gen de la somatostatina	52
4.3. Regulació del polipèptid amiloid dels illots	53

4.4. Transportador de la glucosa 2	54
4.5. Glucocinasa	54

Objectius **55-58**

Objectius	57
-----------	----

Resultats **59-108**

CAPÍTOL I. Cerca del presumpte gen IPF2 en el genoma humà	61
CAPÍTOL II. Anàlisi de l'expressió dels gens ParaHox en ratolí	75
CAPÍTOL III. Expressió dels gens del complexe ParaHox en cultius cel.lulars pancreàtics α TC1 i β TC6	87
ANNEX I. Disseny de construccions i clonatge per a l'expressió de proteïnes a cèl.lules de mamífer	101

Discussió general **109-134**

1. HOX I PARAHOX	111
2. A LA CERCA DE IPF2	113
3. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DELS GENS PARAHOX	115
3.1. Expressió dels ParaHox durant el desenvolupament	116
3.2. Expressió dels ParaHox en teixits adults	116
3.2.1. RT-PCRs	116
3.2.2. Hibridacions <i>in situ</i>	117
3.2.3. Immunodetecció	117
4. PAPER DELS GENS PARAHOX EN LES LÍNIES CEL.LULARS αTC1 i βTC6	124
4.1. PDX1 en β TC6 i α TC1	125
4.2. Els altres gens ParaHox a β TC6 i β TC1	126
4.3. Formació de complexos de transactivació	128
4.4. Efectes de la glucosa	130
5. CONCLUSIÓ	131

Conclusions **135-138**

Conclusions	137
-------------	-----

Bibliografia **139-164**

Bibliografia	141
--------------	-----

Introducció

Introducció

1. DUPLICACIONS GÈNIQUES

1.1. Els gens homeòtics

En una publicació de 1978, Edward Lewis (Lewis 1978) caracteritzà el complex gènic Bithorax (BX-C), format per gens homeòtics arrengrats en el genoma de la mosca. Segons Lewis, aquests gens constituïrien una família gènica, s'haurien originat per duplicacions en tàndem a partir d'un gen homeòtic ancestral i aquest creixement en el nombre de gens homeòtics hauria permès l'adquisició de noves funcions que, més tard, haurien donat lloc a un increment de l'especialització segmentària. Quan les tècniques de biologia molecular varen estar a l'abast dels investigadors, el clonatge i la caracterització d'aquests gens homeòtics va permetre confirmar el model de Lewis, amb algunes consideracions (veure més endavant en la Fig. 1).

Si la duplicació gènica en tàndem era responsable de l'evolució de BX-C, diferents gens homeòtics havien de tenir una seqüència proteïca semblant. Això fou confirmat amb el descobriment de l'*homeobox*: una seqüència conservada de 180 bp, que codifica per un motiu de 60 aa -l'homeodomini-, i compartida pels gens homeòtics del complex (McGinnis et al. 1984); (Scott and Weiner 1984). Aquesta conservació de l'*homeobox* també es donava en els gens dels Complex Antennapedia (ANT-C) revelant així una relació entre els dos complexos: de fet, es creu que un únic complex original, avui anomenat Hox, es trencà en dues parts en el llinatge de *Drosophila*.

L'homeodomini està estructurat en forma de tres (o quatre) hèlix α $\square\square\square\square\square$ pèptid d'unió que permet un gir entre $\square\square\square\square\square\square$ na i tercera hèlix. Així, les proteïnes que el contenen actuen com a factors de transcripció del tipus *helix-turn-helix*. Aquest domini permet la unió d'aquestes proteïnes al DNA, on reconeix la seqüència consens ATTA (revisat a (Gehring 1985)). D'aquest reconeixement en són principals responsables els residus 47 i 51 de l'hèlix III, residus molt conservats entre les diferents proteïnes amb homeodomini.

En el moment en què els gens Hox foren clonats en d'altres organismes (revisat a (Balavoine et al. 2002)) quedà clar que la principal duplicació en tàndem que generà aquests gens, no havia tingut lloc durant l'evolució dels artròpodes i que, per tant, no podia correlacionar-se amb un increment en l'especialització de la segmentació. De fet, dades més recents apunten que un complex d'almenys set gens Hox apareix molt aviat en l'evolució animal, abans de la divergència del llinatge dels protòstoms i deuteròstoms (McLysaght et al. 2002).

1.2. Les duplicacions gèniques

Sosumo Ohno va ser un dels pioners en la introducció de la duplicació gènica com a font per a la macro-evolució i com a fenomen de vital importància per a l'evolució i l'augment en

complexitat dels genomes. El 1970 proposà un model en el qual, quan es dona la duplicació gènica, el segon gen pot acumular mutacions inviàbles però, a vegades, amb una d'aquestes mutacions el gen podria adquirir noves funcions. És a dir, que la duplicació gènica podia facilitar l'aparició d'organismes més complexos, ja que proporcionava material genètic addicional que podia ser utilitzat per la selecció natural. Aquesta duplicació seria més efectiva si un elevat nombre de gens es dupliqués a la vegada, tal com es donaria en una poliploidització. Així va, el portà a suggerir que hi havia hagut una expansió, possiblement per poliploidia, dins el fílum dels cordats després de la separació dels urocordats i anterior a l'origen dels cefalocordats i vertebrats (Ohno 1970) (Fig. 1).

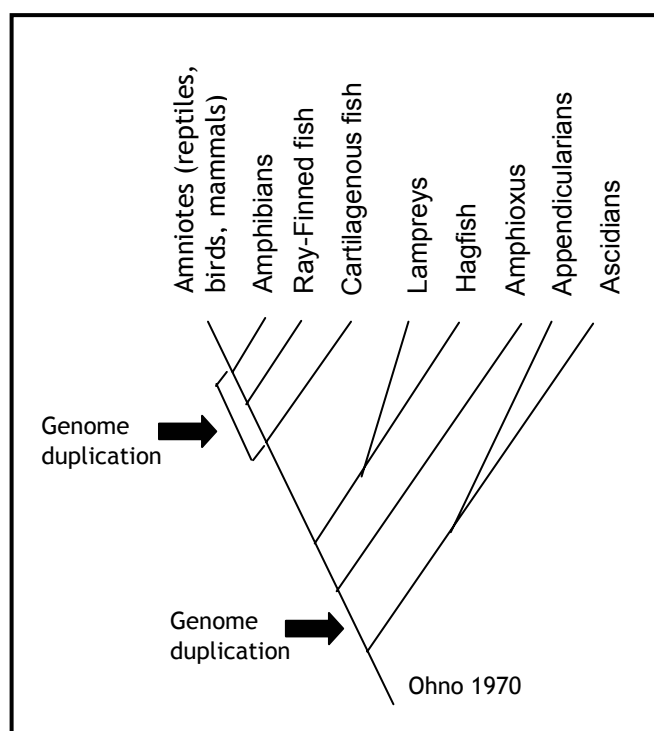


Figura 1. Duplicacions gèniques proposades per Ohno en el llinatge dels cordats. Adaptat de (Holland et al. 1999).

Una de les evidències més importants que Ohno utilitzà per proposar aquest model de duplicacions fou la mida dels genomes. Més tard, utilitzant electroforesi per separar isozims (Schmidtke et al. 1977) va veure que el nombre de gens en amfiox i ascídia era molt semblant, fet que contradeia la idea d'Ohno d'una duplicació després de la separació dels urocordats i abans de l'origen dels cefalocordats. Durant els anys 90, i amb el clonatge d'un gran nombre de gens d'amfiox, ascídia i vertebrats basals, es féu evident que extensius fenòmens de duplicació gènica havien tingut lloc en el llinatge dels vertebrats, després de la divergència dels cefalocordats (veure més endavant).

1.3. Grans duplicacions genòmiques al llinatge dels cordats

Holland i col. (1994) proposen l'existència de dues rondes de duplicacions genòmiques completes durant l'evolució del llinatge dels vertebrats, la primera d'elles després de la separació dels cefalocordats del llinatge dels vertebrats (Fig. 2). Més tard, l'estudi de la complexitat de determinades famílies gèniques (de nou per comparació entre l'amfiox i els vertebrats), la construcció d'arbres filogenètics amb aquests gens, el mapatge cromosòmic d'algun d'aquests gens i la comparació de la mida del genoma de l'amfiox i de determinats vertebrats, els permeten redefinir aquests dos fenòmens de duplicació gènica. La primera fase

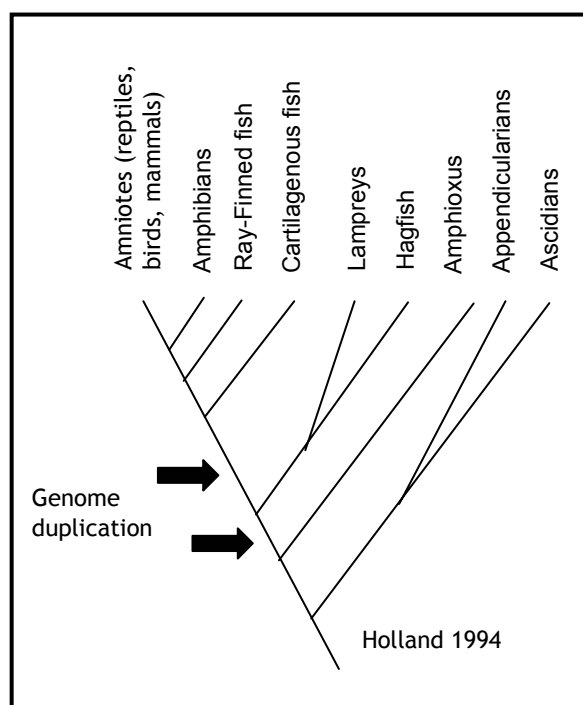


Figura 2. Proposta de dues fases de duplicacions. Modificat de (Holland et al. 1999).

comportaria una duplicació extensa (però no del genoma sencer), mentre que la segona, sí que comportaria una duplicació del genoma sencer (Fig. 2) (Sharman 1996); (Furlong and Holland 2002).

En l'actualitat queden pocs dubtes sobre el fet que aquestes duplicacions genòmiques tingueren lloc; el que resta encara més controvertit és si tingueren lloc per duplicació de tot el genoma o per duplicacions múltiples en *cis* o en *trans*. El que sí sembla evident és que, tant si foren unes com les altres, aquestes varen afectar grans regions del genoma (Holland 1999).

1.4. Història evolutiva de la superfamília Hox

Recentment fou descobert en l'amfiox el complex ParaHox (de 25 Kb), format per tres gens amb *homeobox*: *AmphiCdx*, *AmphiXlox* i *AmphiGsx* (Brooke et al. 1998). Aquest fet canvià la idea que es tractessin de gens orfes de la classe *dispersed Hox*, com es creia fins el moment. La filogènia molecular, combinada amb les dades de mapatge físic, suggerien un probable origen evolutiu comú pels complexos Hox i ParaHox a partir d'un complex ancestral "ProtoHox". L'estudi de l'expressió d'aquests gens en l'amfiox demostrà la seva disposició colínia anàloga a la que presenten els gens Hox, és a dir, el gen ParaHox anterior (*Gsx*) s'expressa en territoris més anteriors que el gen ParaHox posterior (*Cdx*). Així, *AmphiGsx* s'expressa només en el *Haetschek pit*, estructura presumptament homòloga a l'adenohipòfisi dels vertebrats; *AmphiXlox* s'expressa marcadament en forma d'una banda a la paret de l'arquenteró (intestí presumptiu) i *AmphiCdx* s'expressa en regions posteriors.

Així doncs, l'ordre dels gens dins el complex ParaHox reflectiria l'ordre espacial al llarg de l'eix antero-posterior (AP), de manera anàloga a com ho fan els gens Hox. Totes aquestes dades apunten que, molt aviat en l'evolució d'aquests gens i després d'una sèrie de duplicacions genòmiques en tàndem, un gen amb un *homeobox* ancestral donà lloc a un *cluster* de 3 gens: els ancestres dels gens de tipus EHGbox, *extended Hox* i NKL. Cada un d'aquests tres gens patiria duplicacions en tàndem independents, donant lloc a 3 *protoclusters* a la mateixa regió genòmica

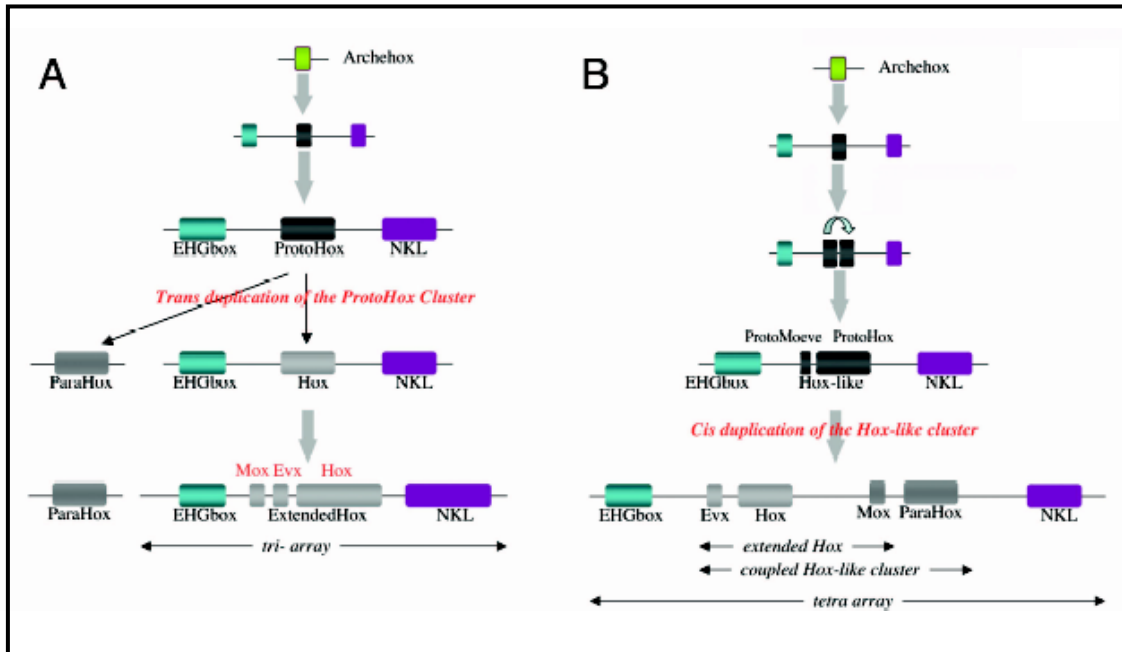


Fig. 3 A) Model de duplicació en *trans* del *cluster* ProtoHox, proposat per Pollard i Holland (2000). B) Model de duplicacions en *cis* del *cluster* ProtoHox, proposat per Minguillón i Garcia-Fernàndez (2003). Adaptat de (Garcia-Fernàndez, 2004).

(Furlong and Holland 2002). Una duplicació discreta del *cluster* ProtoHox va produir l'aparició del *cluster* ParaHox en una altra regió del genoma (que per tant, seria un antic grup germà, paràleg del complex Hox). Els *clusters extended Hox* i NKL patirien duplicacions en tàndem addicionals (Fig. 3A). Minguillón i Garcia-Fernàndez proposen un escenari evolutiu on l'ancestre dels gens *Evx* i *Mox* (no inclosos anteriorment en estudis sobre l'origen i evolució dels *clusters* Hox i ParaHox) es trobava lligat al *cluster* ProtoHox; així una duplicació en tàndem d'una gran regió genòmica aviat en l'evolució dels metazous, va generar els *clusters* Hox i ParaHox, més els seus "veïns" *Evx* i *Mox* (Fig. 3B). El gran *cluster* Hox-like *Evx* Hox/*Mox* ParaHox posteriorment es va trencar, deixant agrupats *Mox*, *Evx* i el *cluster* Hox i aïllant el *cluster* ParaHox (Minguillón and

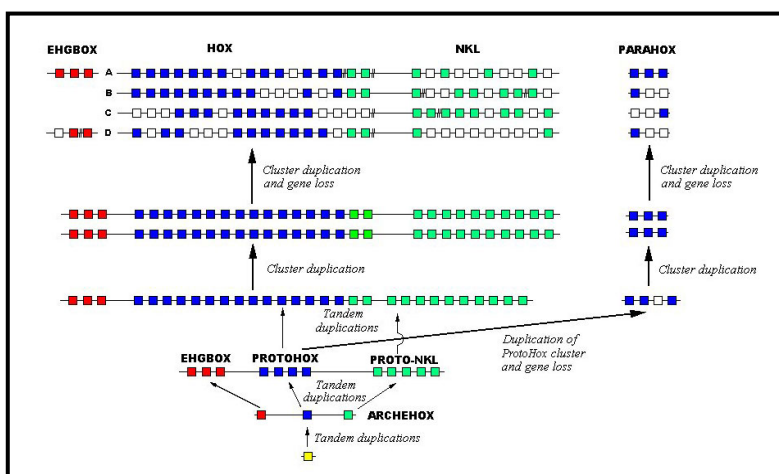


Figura 4. Duplicacions gèniques en tàndem produïren diferents ancestres pels complexos ProtoHox, NK i, probablement, EHGbox. Extret de (Pollard and Holland 1999).

Garcia-Fernandez 2003). Més tard, durant l'evolució dels vertebrats i molt probablement per duplicacions cromosòmiques o del genoma sencer, apareixerien els quatre *clusters* de cada un dels quatre tipus (Fig. 4).

Així doncs, podríem concloure que un complex gènic ParaHox ancestral fou duplicat en l'evolució dels vertebrats, deixant quatre complexos descendents en els mamífers. Fixant-nos en les regions de sintènia entre els genomes d'humà i de ratolí trobem un complex sencer a la posició 13q12 del genoma humà (*Cdx2/3*, *IPF1*, *Gsh1*), l'ortòleg del qual es troba al cromosoma 5 de ratolí. *Cdx4* mapa al cromosoma X tant per humà com per ratolí, i *Cdx1* al 5q31 en humans i al cromosoma 18 en ratolí i *Gsh2* a 4p en humans i al cromosoma 5 de ratolí, a considerable distància de l'únic cluster ParaHox conservat (Fig. 5).

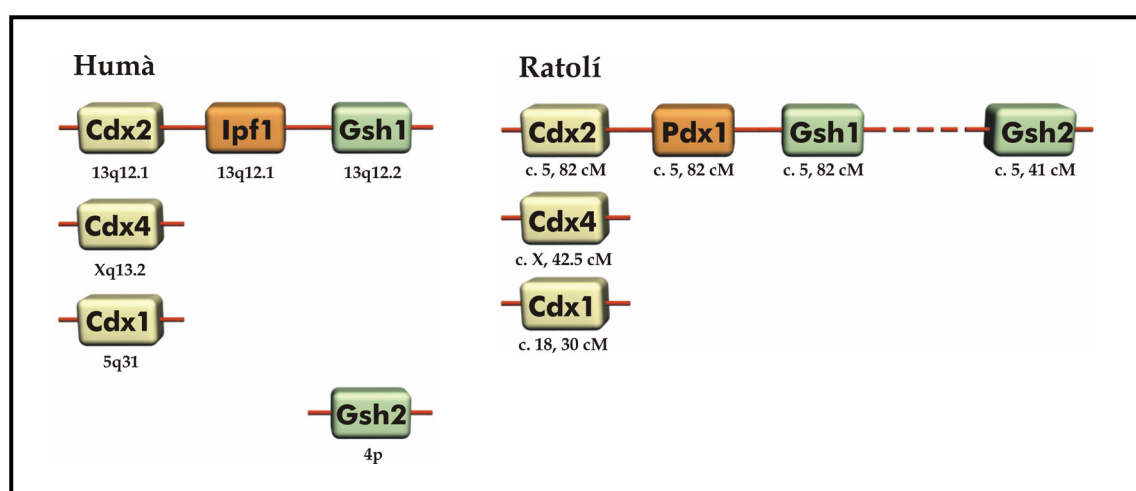


Figura 5. Regions de sintènia en els genomes de ratolí i humà dels complexos ParaHox. El gen *Ip1* humà és l'homòleg de *Pdx1* en ratolí. El *Cdx2* també s'anomena *Cdx2/3*.

Recentment, amb les dades aportades per la publicació del genoma humà, tant Celera (Venter et al. 2001) com IHGSC (IHGSC 2001) mencionen la freqüent detecció de segments duplicats en el genoma. D'aquesta manera la sintènia en les regions descrites dels complexos Hox s'exten, com a mínim, a diversos altres gens circumdants com ara receptors tirosina cinasa, factors d'iniciació de la transcripció, proteïnes ribosomals, gens de la col.làgena, proteïnes de *gap junction*... (Spring 2002).

1.5. Homologia funcional o redundància

Estudis en diverses espècies argumenten que l'expressió dels gens ParaHox ha estat conservada durant l'evolució. Així, s'observa que tots els gens *Cdx* de vertebrats s'expressen en l'intestí i, a més, tenen funcions addicionals en altres teixits, que no es mantenen entre tots els membres de la família, cosa que fa pensar que puguin ser funcions derivades. Per exemple, *Cdx2/3* s'expressa en el pàncrees on regula la transcripció del gen del glucagó, solapant-se parcialment amb la regió d'expressió de *Pdx1*. Al seu torn, *Pdx1* s'expressa en regions centrals

del tub digestiu presumptiu; en mamífers s'expressa en l'endoderm precursor del pàncrees, on és requerit per a la seva correcta formació i funció. Els dos gens *Gsh* descrits en ratolí s'expressen durant el desenvolupament cerebral. *Pdx1* també s'expressa durant el desenvolupament del sistema nerviós central, on s'ocupa de regular l'expressió del gen de la somatostatina (Schwartz et al. 2000).

Aquest solapament parcial en les regions d'expressió dels gens ParaHox, pot estar reflectint una certa redundància en les seves funcions. Per exemple, a l'hora d'especificar l'endoderm primitiu i/o de determinar l'eix AP de l'embrió. De la mateixa manera el *cluster* ParaHox en vertebrats ha mantingut la coliniaritat espacial, propietat per la qual el gen situat a la part 3' del *cluster* (*Gsh*) s'expressa, en l'organisme, en territoris anteriors que els gens situats a la part més 5' (*Cdx*). Per tant, no només l'homologia de seqüència indica que els gens ParaHox són homòlegs i grup germà dels gens Hox, sinó que la propietat de la coliniaritat ho reforçaria (Duboule and Dolle 1989).

1.6. Per què mantenir un *cluster*?

En vertebrats, l'existència de mecanismes de regulació compartits entre diferents gens Hox, tals com l'existència d'elements reguladors comuns a dos gens Hox localitzats un al costat de l'altre o l'existència d'elements reguladors globals, sembla ser la raó evolutiva per la qual s'hauria seleccionat positivament el manteniment del *cluster*. És a dir, caldria mantenir la disposició en *cluster* dels gens Hox per a la seva correcta regulació (Duboule 1998).

Un altre fenomen relacionat amb l'anterior, que pot forçar la disposició en *clusters* dels gens Hox és la coliniaritat temporal, que fa referència a l'expressió ordenada en el temps dels membres del complex. En alguns organismes, els gens Hox situats a la part 3' del complex a més d'expressar-se en territoris anteriors de l'embrió, ho fan abans en el desenvolupament que els gens més 5'. Per al manteniment de la coliniaritat temporal és primordial l'existència del *cluster* (Ferrier and Minguillon 2003). Així, la transposició d'un transgèn amb les regions *cis*-reguladores del gen *Hoxd-9* a una regió més 5' del *cluster* provoca un retard en la seva activació (van der Hoeven et al. 1996). Aquest retard va ser interpretat com una manca d'accessibilitat causada per exemple, per la configuració de la cromatina que inhibia les correctes interaccions reguladores. La validesa d'aquesta hipòtesi es va examinar mitjançant la transposició del mateix transgèn a diferents regions cada vegada més cap a 5' del *cluster* HoxD, fins a trobar una localització en la qual aquest retard de l'expressió desaparegués. Un cop delimitada aquesta regió, es va delectonar i es va observar l'activació prematura dels gens del *cluster*. Així, aquest element era el responsable del silenciament primerenc dels gens situats a la part més 5' del *cluster*, potser mitjançant la unió de proteïnes responsables de l'empaquetament de la cromatina (Kondo and Duboule 1999).

Pel que fa als gens ParaHox, dels quatre putatius *clusters* inicials només se n'hauria mantingut un al llarg de l'evolució, el format pels gens *Cdx2*, *Pdx1* i *Gsh1*. Aquests, tot i que mantenen, a grans trets, la seva coliniaritat espacial, no semblen mantenir la coliniaritat

temporal. Donat que la seva localització com a *cluster* dins del genoma va ser descrita no fa massa temps (Brooke et al. 1998), queda per resoldre la qüestió de si aquests gens podrien compartir una regulació conjunta que fes necessari el seu manteniment com a *cluster*. El que sí que sembla evident és que pels altres gens ParaHox (*Cdx1*, *Cdx4* i *Gsh2*), que es troben dispersos en el genoma, el manteniment del *cluster* no ha estat necessari.

Així doncs, avui en dia, queda per resoldre si el manteniment del *cluster* format per *Cdx2/3*, *Pdx1* i *Gsh1* és necessari per una regulació conjunta o és un vestigi del seu ordenament inicial, mantingut al llinatge d'alguns cordats.

2. ELS GENS DEL CLUSTER PARAHOX

Els gens ParaHox es van començar a estudiar com a gens aïllats de tipus Hox, també anomenats gens Hox orfes. No és fins el 1998 que Brooke i col. els descriuen com a *cluster* en el cefalocordat amfiox. Per tant, l'estudi de les seves funcions és anterior a la identificació com a *cluster* i s'ha realitzat de manera independent per a cada gen, sense tenir en compte la possible regulació conjunta que pot comportar el manteniment del *cluster* al llarg de l'evolució.

Tots els gens ParaHox codifiquen per factors de transcripció que comencen a expressar-se de manera primerenca durant el desenvolupament de l'embrió i, en aquests estadis, actuen en vies que intervenen en la formació del patró (en certs casos a través de la regulació dels gens Hox) i en el desenvolupament d'òrgans com l'intestí, el pàncrees o el cervell. Ja en l'adult, la seva activitat queda més restringida a certes funcions que poden dur a terme actuant directament sobre gens diana (com el gen de la insulina o el glucagó), així com intervenint en el manteniment de l'estat diferenciat en alguns òrgans com l'intestí i el pàncrees. Cal tenir en compte que aquests gens han estat estudiats principalment com a gens similars als Hox i, per tant, com a gens importants durant el desenvolupament de l'embrió. Les dades que es tenen sobre les seves funcions en adult estan limitades a la seva implicació en malalties tant prevalents com el càncer de còlon o la diabetes.

En aquest capítol, s'intentarà donar una visió general sobre el que se sabia d'aquests gens, fins al moment d'iniciar aquest treball, i sobre quines funcions han estat descrites tan en l'embrió, com en l'adult.

2.1. Els gens *cdx*

El primer membre de la família *Cdx* identificat, el gen *Cad* de *Drosophila*, codifica per un factor de transcripció de 427 amino àcids, que conté un homeodomini (Mlodzik and Gehring 1987); (Levine et al. 1985). *Cad* és necessari per l'especificació de la part posterior de l'embrió, on regula l'expressió de gens *gap* i *pair-rule* i intervé en els processos de gastrulació i formació del patró de l'intestí posterior i dels discs imaginals genitals. Ha estat proposat que *Cad* actua de manera anàloga als productes dels gens Hox, especificant la identitat del segment posterior

abdominal A10. Tot i així, *Cad* no es troba lligat als loci BX-C o ANT-C (Hox) i, per tant, no es classifica com un gen Hox (revisat en (Houle et al. 2003)).

En vertebrats, tals com a *Xenopus* i ratolí, les proteïnes Cdx estan involucrades en la especificació de l'embrió posterior i la formació de l'eix AP, de manera anàloga a com funciona *Cad* a *Drosophila*. Però a diferència de la mosca, on *Cad* funciona de manera semblant als Hox per especificar la identitat dels segments, en vertebrats les proteïnes CDX actuen per sobre dels gens Hox.

2.1.1. Patró d'expressió dels gens Cdx en l'embrió de ratolí

Els gens *Cdx1*, *Cdx2/3* i *Cdx4* de ratolí són homòlegs de *Cad* de *Drosophila*. Cada un d'aquests homòlegs ha estat aïllat en un nombre considerable d'espècies de vertebrats (revisat en (Freund et al. 1998)) i, en diversos casos, s'en han descrit patrons de transcripció similars. Així doncs, la informació de l'expressió i funció dels Cdx en ratolí és aplicable a d'altres espècies de mamífers i, segurament, als vertebrats en general.

Cdx1. El gen de ratolí *Cdx1* està organitzat en tres exons i dos introns, que es transcriuen en un mRNA de 1'7-1'8 kb, que codifica per una proteïna de 268 aminoàcids (Hu et al. 1993).

Tal com es resumeix en la figura 6 els primers transcrits de *Cdx1* s'observen el dia E7'5 de l'embrió (en la Taula.1 s'indiquen el nombre de somites a què correspon cada estadi de gestació), a l'ectoderm i al mesoderm naixent, a una àmplia regió de la línia primitiva (Meyer and Gruss 1993).

ESTADIS	SOMITES
E8 (7,5-8,75)	1-4
	5-7
E8,5 (8-9,25)	8-12
E9 (8,5-9,75)	13-20
E9,5 (9-10,25)	21-29
E10 (9,5-10,75)	30-34
E10,5 (10-11,25)	35-39
E11 (10,5-11,25)	40-44
E11,5 (11-12,25)	45-47
E12 (11,5-13)	48-51
E13 (12,5-14)	52-55
E14 (13,5-15)	56-60

Taula.1 En la primera columna s'indiquen els dies de gestació (E) o dpc (*days post coitum*) i entre parèntesis el rang en què es poden observar diferències en l'estadi de desenvolupament en embrions em el mateix estadi de gestació. En la segona columna s'indiquen el nombre de somites que correspon a cada estadi de gestació.

El dia E7'75 l'expressió en l'ectoderm neural s'extén fins a un límit anterior a nivell del solc preòtic en el cervell posterior presumptiu, amb una expressió lleugerament posterior al mesoderm. Després, l'expressió de *Cdx1* en l'ectoderm neural retrocedeix fins arribar, en estadis més tardans a un límit anterior, a nivell de la mèdula espinal presumptiva. A l'ectoderm neural, *Cdx1* comença a ser localitzat a la regió dorsal dels plegaments neurals i en algunes noves poblacions de cèl.lules migratòries de la cresta neural. *Cdx1* també es detecta en el mesoderm paraxial naixent i en els somites, on l'expressió comença a quedar restringida en el dermatotom presumptiu, essent la seva expressió més forta en la part anterior dels somites. A

E9'5 s'observen transcrits en el mesènquima de l'esbós de les extremitats anteriors, i a nivells més baixos, el dia E10'5 a l'esbós de les extremitats posteriors. *Cdx1* també es detecta en la corda nefrogènica i després, en els conductes mesonefrítics. Al llarg d'aquests estadis, l'expressió de *Cdx1* continua en la regió de la línia primitiva i en el mesoderm generador de l'esbós de la cua, amb una devallada de l'expressió al voltant del dia E12 (revisat en (Houle et al. 2003)).



Figura 6. Representació de l'expressió dels Cdx en l'embrió de ratolí entre E7,5-E9,5. Extret de (Lohnes 2003).

Cdx2/3. El gen *Cdx2/3* de ratolí està organitzat en tres exons i dos introns, que es transcriuen en un mRNA de 2,2 Kb, que codifica per una proteïna de 311 aminoàcids (James et al. 1994). *Cdx2/3* presenta un patró d'expressió primerenc en el trofoectoderm extraembrionari el dia E3'5 i continua expressant-se en placenta fins almenys, el dia E12'5 (Beck et al. 1995) (Fig. 6). L'expressió embrionària de *Cdx2/3* comença després de la de *Cdx1*, iniciant-se el dia E8'5 en tots els teixits de la línia primitiva i en la base de l'alantoi. També s'observen transcrits de *Cdx2/3* en la placa neural posterior i la notocorda, en l'endoderm de l'intestí posterior i en el mesoderm paraxial no segmentat. L'expressió en aquest teixit continua en l'esbós de la cua fins a extingir-se cap el dia E 12'5.

Cdx4. El gen *Cdx4* està organitzat en 3 exons i dos introns que es transcriuen en un mRNA de 1'6 kb, que codifica per una proteïna de 282 aminoàcids. *Cdx4* presenta un patró d'expressió més restringit que *Cdx1* i *Cdx2/3* (Gamer and Wright 1993). En E7'5 s'en comencen a detectar nivells

baixos d'expressió a l'alantoi i a la punta posterior de la línia primitiva (Fig. 6). En els estadis primerencs de la neurulació, *Cdx4* s'expressa en la regió de la línia primitiva, amb nivells que incrementen cap a la regió caudal de l'embrió. En el mesoderm paraxial, l'expressió arriba a un límit anterior, que és posterior al somita format més recentment, mentre que l'expressió en el neuroectoderm és lleugerament anterior. Després de l'estadi E10'5, l'expressió de *Cdx4* deixa de detectar-se en la part posterior de l'embrió.

2.1.2. Els gens *Cdx* i el patró de l'eix anteroposterior

En *Drosophila*, el gen *Cad* està involucrat en l'especificació de la regió caudal de l'embrió i en la formació del patró AP. Experiments de direccionament gènic han posat en evidència que aquestes dues funcions han estat conservades en els gens ortòlegs *Cdx1* i *Cdx2/3* del ratolí (Subramanian et al. 1995); (Chawengsaksophak 1997).

El mutant nul de *Cdx1* sobreviu fins a la vida adulta i té una aparença normal, tot i que presenta homeosi de la columna vertebral i transformacions homeòtiques anteriors típiques, que afecten les regions toràciques cervicals i superiors. Els nounats heterozigots també presenten alguns d'aquests defectes, fet que demostra la importància dels nivells de *Cdx1* per a la correcta determinació del patró AP.

Els mutants homozigots nuls per *Cdx2/3* no sobreviuen passat el dia E3'5, probablement perquè pateixen defectes en el trofoectoderm, on *Cdx2/3* s'expressa en estadis primerencs (Chawengsaksophak 1997). De la mateixa manera que en els mutants nuls per *Cdx1*, l'heterozigot *Cdx2/3 +/-* també presenta transformacions homeòtiques vertebrals, que afecten típicament les vèrtebres cervicals posteriors i les toràciques anteriors. Aquests defectes se solapen amb la regió de la columna vertebral afectada en els homozigots *Cdx1 -/-*, extenent-se a territoris posteriors. Els defectes que s'observen en aquestes mutacions reflecteixen els patrons d'expressió d'aquests dos gens durant el desenvolupament, amb *Cdx1* expressat abans en el temps i *Cdx2/3* expressat en regions anteriors. L'heterozigot *Cdx2 +/-* també presenta una cua truncada. Tot i que no es coneixen massa bé les bases d'aquesta malformació, sembla que diferiria del mecanisme que dona lloc a les malformacions homeòtiques en les vèrtebres, i podria ser un paper remissent de la funció que el gen *Cad* de *Drosophila* té en l'especificació posterior.

Cdx4 es localitza en el cromosoma X i normalment és inactivat en el ratolí durant el procés de lionització o inactivació del cromosoma X a les femelles (Pownall et al. 1996). Aquest lligament cromosòmic pot provocar problemes en la transmissió d'un gen diana a la línia germinal, i aquesta pot ser la raó per la qual encara no s'en ha aconseguit el mutant nul. Tot i així, sembla ser que *Cdx4* té un paper important en l'establiment de l'eix AP i en esdeveniments relacionats amb l'especificació posterior de l'embrió. En estudis de guany o pèrdua de funció de *XCad3*, homòleg de *Cdx4* en *Xenopus*, s'observen profunds efectes en el desenvolupament del capgròs; l'expressió ectòpica de la forma constitutivament activa de *XCad3*, inhibeix el desenvolupament anterior, mentre que l'expressió de la forma dominant negativa resulta en pèrdua del tronc i d'estructures de la cua (Pownall et al. 1996); (Isaacs et al. 1998). L'expressió ectòpica de *Cdx4* en ratolí pot induir, al seu torn, l'expressió ectòpica del seu putatiu gen diana

Hoxb8, que té funcions en l'establiment del patró A/P en els vertebrats (Charite et al. 1998). Tant estudis de regulació del promotor de *Hoxb8* mediats per *Cdx4* (Charite et al. 1998), com estudis de mutants de *Cdx4* a peix zebra (Davidson et al. 2003) demostren que aquest gen regula l'expressió d'alguns gens Hox i que actua de forma jeràrquica per sobre dels gens Hox en l'especificació del patró AP.

2.1.3. Especificitat o redundància funcional?

De la mateixa manera que passa en moltes famílies multigèniques, queda per aclarir si la funció dels diferents Cdx és redundant o específica. L'observació que les seqüències dels diferents membres de la família Cdx presenten molt poques similituds excepte en l'homeodomini, apuntarien a una funció específica per a cadascun dels membres. Això és veu recolzat pels estudis de pèrdua de funció. L'homeosi vertebral del mutant nul *Cdx1* *-/-* i l'heterozigot *Cdx2* *+/-* són molt diferents, tot i que presentin zones sobreposades a la regió cervical posterior i toràcica anterior (Subramanian et al. 1995); (Chawengsaksophak 1997). La pèrdua de *Cdx2/3* en heterozigosi, però no la de *Cdx1*, provoca lesions en el còlon, tot i que els dos gens es coexpressen en les cèl.lules de les criptes (Freund et al. 1998). Altres defectes axials posteriors són específics dels heterozigots *Cdx2* *+/-*, tot i que tots els membres de la família Cdx s'expressen en la regió caudal de l'embrió (Chawengsaksophak 1997).

Les evidències a favor d'una funció almenys parcialment redundant es basen en estudis fets recentment per anàlisi de mutants compostos de diferents al·lels *Cdx1-Cdx2/3* (van den Akker et al. 2002). El mutant nul de *Cdx1* *-/-* i el doble heterozigot *Cdx1* *+/-Cdx2/3* *+/-*, presenten uns defectes en les vèrtebres idèntics, mentre que els mutants *Cdx1* *-/-* *Cdx2/3* *+/-* presenten una homeosi vertebral més acusada que l'observada en cada un dels mutants simples. A més, la severitat de la truncació axial observada en *Cdx2/3* *+/-*, augmenta amb la pèrdua de *Cdx1*. Aquestes observacions demostren clarament que *Cdx1* i *Cdx2/3* tenen funcions solapades, almenys pel que fa al patró AP vertebral i a l'especificació de l'embrió posterior.

2.1.4. El patró vertebral i les senyals reguladores de Cdx

La pèrdua de *Cdx1* i/o *Cdx2/3* provoca transformacions vertebrales homeòtiques depenents de dosi que afecten, primerament, regions cervicals i toràciques anteriors. Certes evidències suggereixen que aquests defectes reflecteixen el paper que els gens Cdx tenen en la regulació de l'expressió de determinats membres de la família dels gens Hox (Ferrier and Holland 2001); (Lewis 1978); (Lewis 1994); (Trainor and Krumlauf 2001). La localització física en el genoma dels gens Hox queda reflectida en el patró d'expressió espacial i temporal que presenten al llarg del desenvolupament de l'eix, el fenomen de la col·linearitat (Krumlauf 1994); (Duboule 1998). Com ja s'ha esmentat, els gens Hox situats més a 3' del *cluster*, s'expressen generalment en estadis més primerencs i amb un límit d'expressió més rostral que els gens situats a 5'. Aquestes dades, juntament amb els experiments de guany i/o pèrdua de funció, porten a la hipòtesi del "codi Hox", que suggereix que la combinació de les proteïnes Hox expressades en un nivell axial determinat, com per exemple els somites o les prevèrtebres, és important per determinar-ne el

patró de desenvolupament (Kessel and Gruss 1991). Així doncs la regulació transcripcional dels gens Hox és vital per al correcte patró al llarg de l'eix AP.

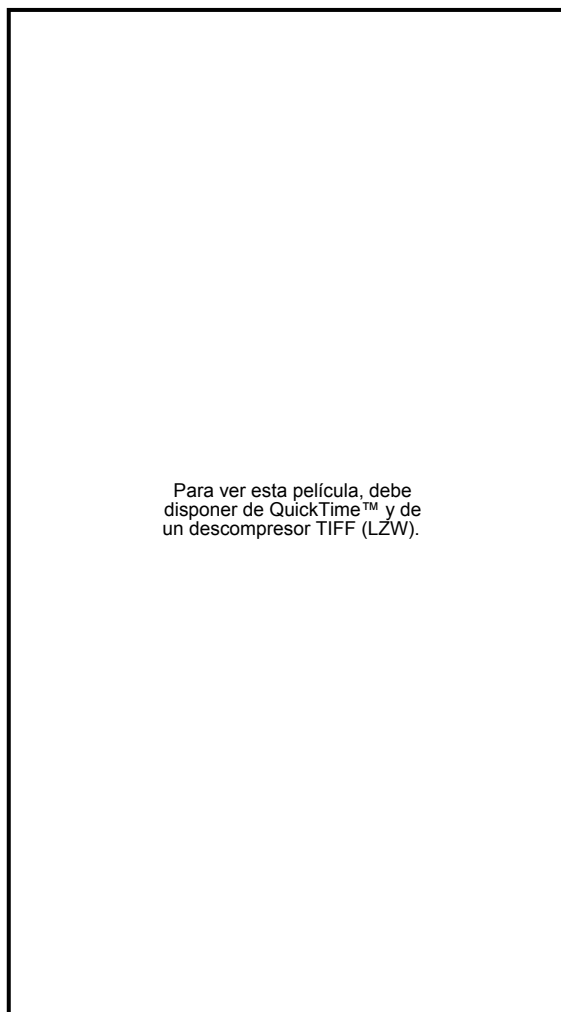


Figura 7. Relació de RA i els gens Hox amb el patró vertebral. RA exògen i el guany de funció dels gens Hox resulten en unes transformacions vertebrals similars. La pèrdua de RA o de certs gens Hox, provoquen homeosis similars. Extret de (Lohnes 2003).

vitamina A, l'àcid retinoic (RA) (Fig. 7), alguns membres de la família Wnt/wingless i el factor de creixement fibroblàstic FGF (Fig. 8). En determinades condicions aquests factors poden reprimir marcadors d'identitat anterior i induir l'expressió de gens associats amb la part posterior de l'embrió, com poden ser alguns gens Hox (Nieuwkoop 1999); (Altmann and Brivanlou 2001). Basant-se en aquestes propietats, alguns d'aquests factors, com RA, alguns Wnt i alguns FGF han estat definits com a factors de posteriorització. Molts estudis suggereixen que alguns dels Cdx poden actuar en part, passant informació des d'aquestes molècules de senyalització posteriors cap als gens Hox (Fig. 8).

Així, les transformacions vertebrals són sovint degudes a la inactivació dels gens Hox, i també es poden observar en models de guany i pèrdua de funció de *Cdx1* i *Cdx2/3*. Aleshores, sembla raonable pensar que els membres de la família Cdx funcionin més amunt en la cascada gènica que els gens Hox. Les proteïnes dels gens Cdx actuen com a factors de transcripció, unint-se als elements reguladors en *cis* (CDRE) que es troben en molts dels *locis* Hox (Subramanian et al. 1995). Aquestes observacions, juntament amb el fet que la multimerització d'alguns CDREs provoca l'anteriorització de l'expressió d'un gen informatiu (*reporter*), sembla indicar que els nivells absoluts de les proteïnes Cdx, són importants alhora de determinar la seva funció i que el nombre o l'afinitat dels CDREs, pot determinar l'expressió de diversos gens Hox diana a partir del gradient de Cdx al llarg de l'eix AP (Fig. 7). D'aquesta manera, els factors de transcripció Cdx impacten sobre el patró vertebral, regulant directament els gens Hox.

L'especificació i el patró de l'embrió posterior, depenen també d'un determinat nombre de molècules de senyalització. Algunes d'especial rellevància són: la

De fet, s'ha demostrat la importància que les vies de senyalització del RA, així com Wnt3A, tenen sobre la regulació de l'expressió de *Cdx1*, que al seu torn, regula l'expressió dels gens *Hox i*, per tant, actuarien sobre l'especificació dels territoris posteriors (Rossant et al. 1991); (Leo and Chen 2000); (Lickert and Kemler 2002) (Fig. 8).

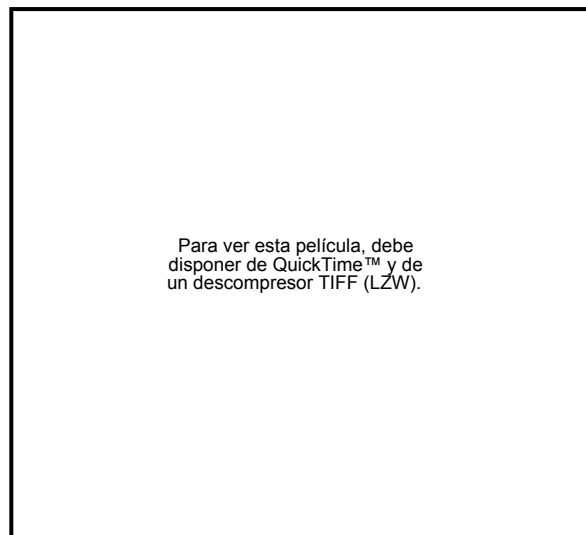


Figura 8. Model de regulació dels gens *Hox* pels *Cdx*. Regulació de l'expressió de *Cdx* per RA, Wnt o FGFs. Extret de (Lohnes 2003).

Tant *Wnt* com RA tenen efectes de posteriorització, i en *Xenopus*, poden interactuar per activar gens implicats en el desenvolupament posterior (Altmann and Brivanlou 2001); (Sasai and De Robertis 1997); (Ikeya and Takada 2001). Ja que *Wnt* i RA són efectors directes de l'expressió de *Cdx1*, algunes de les interaccions entre aquests vies de senyalització que podrien ser sinèrgiques (Prinos et al. 2001), poden tenir lloc convergint en la regulació de *Cdx1*.

2.1.5. *Cdx1* i *Cdx2* en intestí

Durant la vida adulta, l'expressió de *Cdx1* i *Cdx2/3* queda sobretot restringida a l'epiteli intestinal, tot i que *Cdx2/3* també s'expressa en el pàncrees, on regula l'expressió del glucagó (Laser et al. 1996). L'epiteli intestinal es renova constanment a partir de les cèl.lules mare que es troben ancorades a la part inferior de les invaginacions anomenades criptes intestinals. Les cèl.lules filles generades per aquestes cèl.lules mare, proliferen i es diferencien en quatre tipus cel.lulars principals: les cèl.lules absortives, les cèl.lules secretores de mucus, les enteroendocrines i les cèl.lules de Paneth. Aquestes cel.lules, amb l'excepció de les de Paneth, migren al llarg de la columna epitelial mentre s'atura la proliferació i es dona la diferenciació.

Cdx1 s'expressa en el compartiment de les criptes on es dona la proliferació cel.lular (Silberg et al. 1997) i la seva inhibició per RNA antisentit disminueix la proliferació cel.lular *in vitro* (Lorentz et al. 1997). L'expressió de *Cdx2/3* es dona sobretot en els enteròcits diferenciats (James et al. 1994) i provoca retardament en el creixement i proliferació cel.lular *in vitro* en diverses línies cel.lulars intestinals (Lorentz et al. 1997); (Suh and Traber 1996). Tot i que la implicació d'aquests dos factors de transcripció en la proliferació i diferenciació de l'epiteli intestinal ha estat ampliament demostrada, la seva funció i implicació en el desenvolupament de processos carcinogènics de l'intestí, continua essent controvertida.

Cdx2/3 ha estat descrit com un supressor tumorogènic del còlon, ja que el ratolí *Cdx2/3+/-* desenvolupa múltiples adenomes en el còlon (Chawengsaksophak 1997). A més l'expressió de *Cdx2/3* sembla disminuir en el càncer de còlon, proporcionalment a la severitat del tumor (Mallo et al. 1997); (Guo et al. 2004). Ha estat proposat que *Cdx2/3* duu a terme la seva funció de supressor tumoral, unint-se a la regió promotora de *Cdx1* per tal d'inhibir-lo; però fins ara, no s'ha trobat cap unió directa en aquest promotor (Domon-Dell and Freund 2002).

La funció de *Cdx1* en el desenvolupament de tumors intestinals encara està menys clara. Tot i que la seva expressió sembla disminuir en alguns càncers de còlon, sembla difícil que pugui tenir un paper de supressor tumoral tal com apunten alguns grups (Jang et al. 2002); (Guo et al. 2004), ja que no s'han descrit tumors de còlon en el ratolí KO homozigot. D'altre banda, altres dades suggereixen un potencial oncogènic de *Cdx1*: l'expressió ectòpica de *Cdx1* provoca desenvolupament de metaplàsia intestinal (Silberg et al. 1997), la seva sobreexpressió estimula la tumorigènesi (Maulbecker and Gruss 1993) i la inhibició de la seva expressió en la línia cel.lular de còlon Caco-2 mitjançant RNA antisentit, provoca una disminució en la proliferació (Lorentz et al. 1997).

En l'intestí adult, *Cdx2/3* actua també regulant la transcripció d'alguns gens intestinals, unint-se als seus promotors. Per exemple, la transcripció específica en els enteròcits diferenciats de l'intestí del gen de la sacarasa-isomaltasa, depèn de la unió específica de teixit de la proteïna CDX2/3 a un element del seu promotor, conservat al llarg de l'evolució. *Cdx2/3* també regula altres gens importants per a la funció de l'intestí. Tant en les cèl.lules L de l'intestí, com en les cèl.lules dels illots pancreàtics, *Cdx2/3* regula la transcripció del gen del glucagó unint-se a l'element G1 del seu promotor formant un heterodímer amb el factor de transcripció *Pax6* (Ritz-Laser et al. 1999).

2.2. Els gens Gsh

2.2.1. El gen *Gsh1*

El gen *Gsh1* està organitzat en 2 exons i un intró, que es transcriuen en un mRNA de 1786 bp, que codifica per una proteïna de 261 aminoàcids. La seqüència de cDNA del gen *Gsh1* codifica per un motiu ric en prolines, una zona de polialanines i un homeodomini (Valerius et al. 1995). A ratolí *Gsh-1* es comença a expressar en el sistema nerviós central en el E8'5 i desapareix cap a l'estadi E13'5. Els seus transcrits es detecten al llarg del tub neural i en el cervell posterior, i continua bilateralment, en una franja de forma simètrica en el teixit neuroepitelial. També s'expressa en la part anterior del mesencèfal, el diencèfal, el tàlam i l'hipotàlam. Mutacions a *Gsh1* provoquen efectes pleiotròpics en el desenvolupament i la funció de la glàndula pituitària (Li et al. 1996). Els mutants nuls en homozigosi presenten enanisme extrem, infantilisme sexual i una mortalitat perinatal significativa. Al mateix temps la producció d'algunes hormones pituitàries com l'hormona del creixement, la prolactina i l'hormona luteinizant es veu disminuïda. Tot i que la morfologia de l'hipotàlam és d'aparença normal, també es veu afectat en els mutants, ja que tant el promotor de l'hormona alliberadora de

l'hormona de creixement (GHRH), com el promotor del mateix *Gsh1*, presenten diverses còpies de la seqüència de DNA consensus que uneix la proteïna GSH1. Aquest fenotip mutant, indica un paper crític de *Gsh1* en la formació i funció de l'eix hipotalàmic-pituitària.

Per tal d'identificar altres gens diana de *Gsh1*, es van establir unes línies cel·lulars progenitores del sistema nerviós central que tenien el gen *Gsh1* inactivat, i es va comparar la seva expressió gènica (mitjançant anàlisis de microxips d'expressió *Affymetrix GeneChip*), amb la mateixa línia cel·lular que expressava *Gsh1* de manera normal. S'analitzaren les diferències de transcrits que hi havia entre les dues línies cel·lulars, i es va observar que els gens *drm* i *gas1*, que reprimeixen la proliferació cel·lular, es trobaven activats en les cèl·lules que expressaven *Gsh1* de manera normal. Aquestes observacions indiquen que *Gsh1* funciona regulant la proliferació cel·lular (Li et al. 1999).

2.2.2.El gen *Gsh2*

El gen *Gsh2* està organitzat en 2 exons i un intró, que es transcriuen en un mRNA de 1679 bp, que codifica per una proteïna de 305 aminoàcids, amb un homeodomini i diverses zones de polihistidines i polialanines (Hsieh-Li et al. 1995). La seva expressió comença el dia E10'5 en una banda de cèl·lules neuroepiteliales primitives en el tub neural, el mesencèfal i el telencèfal. Entre el E11'5-E13'5 continua observant-se un patró d'expressió clarament restringit en el sistema nerviós central. El senyal es dona de forma simètrica però, més fina, en àrees del cervell anterior, mig i posterior. Les regions preentriculars corresponents al nucli talàmic en desenvolupament, l'eminència ganglionar, la regió hipotalàmica i el cervell posterior al llarg de les parets laterals del quart ventricle, presenten unes bandes d'expressió molt intenses i ben localitzades. El dia E14'5 la senyal encara és observable en el cervell, però menys intensa. A l'estadi E16'5 ja no es detecta expressió de *Gsh2*.

L'expressió de *Gsh2* és induïda per *shh*, i en els mutants de *shh*, no es detecta expressió de *Gsh2* (Corbin et al. 2000). Els embrions nuls *Gsh2* *-/-* pateixen una especificació primerenca dels precursors de l'eminència ganglionar lateral (LGE), provocant disrupcions en el desenvolupament del bulb estriat i del bulb olfactori. Aquest efecte es dona només a precursors cel·lulars primerencs, mentre que en estadis posteriors, la identitat molecular d'aquestes cèl·lules apareix normalitzada. Paral·lelament a aquests fets, l'expressió de *Gsh1* es veu expandida en el LGE de *Gsh2* *-/-* (Toresson and Campbell 2001). Tot i que no s'observen defectes obvis en el desenvolupament dels bulb olfactoris i estriat de l'embrió *Gsh1* *-/-*, els homozigots dobles mutants nuls per *Gsh1/2*, presenten disrupcions molt més severes de les observades en el mutant *Gsh2* sol, per tant les cèl·lules precursors de LGE presenten una identitat molecular també més perturbada. Així queda demostrada la importància de *Gsh1* en el desenvolupament del bulb olfactori i estriat, del ratolí *Gsh2* mutant. Aquests fets indiquen que els gens *Gsh* tenen un paper en el control dels *pools* de precursors LGE, ja que la disminució de còpies dels al·lels de *Gsh1* i *Gsh2* resulta en una disminució notable del nombre de cèl·lules precursors, particularment en la zona subventricular.

L'homeodomini d'aquests dos gens és idèntic en un 97% i sembla que els seus dominis funcionals han estat conservats al llarg de l'evolució, tal com s'en dedueix de les seqüències conservades entre la comparació de *Gsh1* de ratolí i *Ol-Gsh1* del teleosti *Oryzias latipes* (Deschet et al. 1998). Els transcrits de *Ol-Gsh1*, coincidint amb els de *Gsh1* de ratolí, es troben en diferents regions del sistema nerviós central: la mèdulla espinal, el romboencèfal dorsal, el tèctum òptic, el diencèfal dorsal, l'anàlgen de l'hipotàlamus i el telencèfal rostral.

2.3.El gen *Pdx1*

2.3.1.Regulació del gen *Pdx1*

El gen *Pdx1* humà es localitza a la posició cromosòmica 13q12.1 i està constituït per dos exons separats per una regió d'aproximadament 6 kb (Stoffel et al. 1995); (Sharma et al. 1996). El gen *Pdx1* de ratolí ha estat mapat a la regió distal del cromosoma 5, i el *Pdx1* de rata en el cromosoma 12 (Fiedorek and Kay 1995); (Yokoi et al. 1997). La proteïna PDX1 humana està formada per 283 aminoàcids i té un pes molecular estimat de 31 Kd. El seu domini d'activació es troba en la regió NH₂-terminal i l'homeodomini, entre els aminoàcids 146 i el 206. A més, tots dos dominis prenen part en interaccions proteïna-proteïna (Peers et al. 1994); (Peers et al. 1995); (Asahara et al. 1999); (Glick et al. 2000); (Marshak et al. 2000); (Dutta et al. 2001); (Qiu et al. 2002) (Fig. 9).

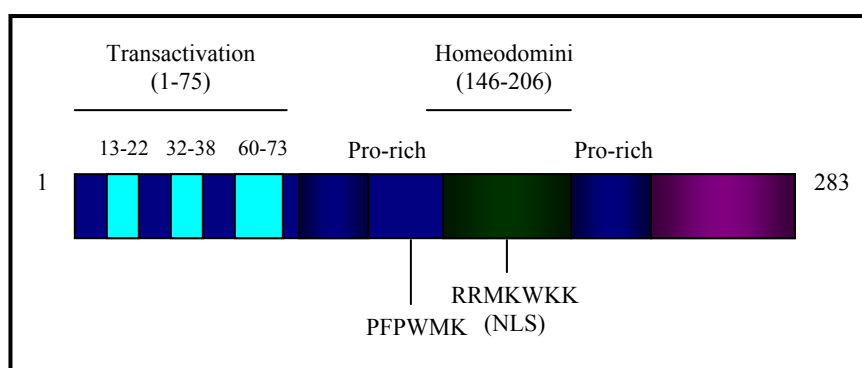


Figura 9. Estructura esquemàtica de *Pdx1* que conté dos exons amb un homeodomini separat per un intró. Adaptat de (McKinnon and Docherty 2001).

El promotor del gen *Pdx1* no té caixa TATA i presenta tres llocs d'inici de la transcripció (Sharma et al. 1996). La seqüència 5' UTR es d'aproximadament 100 nucleòtids. La seva seqüència proteica mostra un elevat grau de similitud entre el ratolí i diferents espècies: 90% amb el hamster, 88% amb la rata, 87% amb el ratolí i 68% amb *Xenopus*. Fins i tot en peix zebra, la seqüència de l'homeodomini comparteix un 95% de similitud amb la seqüència dels mamífers (Milewski et al. 1998) (Fig. 10).

Estudis de mutagènesi dirigida, realitzats en la regió N-terminal de *Pdx1*, revelen l'existència d'un domini de transactivació, que conté tres subdominis conservats durant l'evolució: aminoàcids 13-22 (subdomini A), aminoàcids 32-38 (subdomini B), i aminoàcids 60-73

(subdomini C) (Peshavaria et al. 1997). En la regió intermedia, es localitza l'homeodomini, que conté una triple hèlix flanquejada a cantó i cantó per una seqüència rica en prolines. L'homeodomini de PDX1, a més de tenir un paper crític en la unió a DNA, conté un senyal de localització nuclear en la hèlix III, format per 7 aminoàcids (RRMKWKK) conservats en ratolí, rata i humans (Hessabi et al. 1999); (Moede et al. 1999) (Fig. 9).

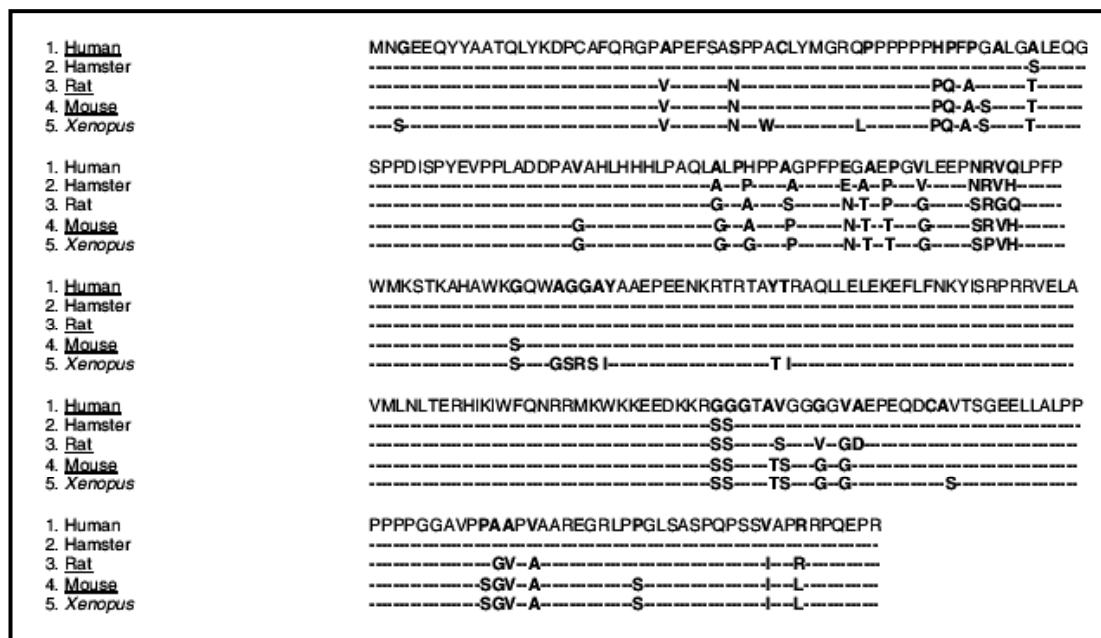


Figura 10. Alineament de seqüències de *Pdx1* de diferents espècies, on queda palesa la seva elevada conservació. Extret de (Hui and Perfetti 2002).

Tot i que ha estat descrit que en la regulació de la transcripció del gen de la insulina és crucial el transport de PDX1 des de citoplasma a nucli, depenent de la fosforilació causada per elevats nivells de glucosa i insulina, encara queda per determinar si l'exportació des del nucli cap al citoplasma, tant a nivell de proteïna com de mRNA, pot jugar també un paper determinat en la regulació de la seva funció com a regulador de l'expressió de gens diana (Rafiq et al. 1998); (Macfarlane et al. 1999); (Elrick and Docherty 2001). L'hexapeptid del tipus *anntennapedia* (PFPWMK), present en la regió rica en prolines anterior a l'homeodomini, media l'heterodimerització en l'element regulador del promotor de la somatostatina (SST), amb el factor de transcripció, també amb homeodomini, PBX1 (Peers et al. 1995); (Goudet et al. 1999).

Com ja ha estat esmentat anteriorment, durant l'organogènesi *Pdx1* s'expressa en totes les cèl.lules que s'estan diferenciant cap a un destí exocrí i endocrí del pàncrees. En el pàncrees adult, *Pdx1* s'expressa predominantment en les cèl.lules β dels illots productores d'insulina i en algunes cèl.lules δ productores de SST, però és gairebé indetectable en els altres tipus cel.lulars (Guz et al. 1995); (Sander et al. 1997). En els últims anys, estudis realitzats per diferents grups, utilitzant ratolins transgènics, cèl.lules en cultius, anàlisis de *Dnasa I footprinting* i assajos de retard en gel (EMSA), han estat de gran importància per tal d'esbrinar els mecanismes i els

factors que controlen l'expressió i l'activitat de *Pdx1* durant l'embriogènesi i en les cèl.lules madures dels illots.

Elements reguladors distals en el promotor del gen *Pdx1* de rata i humà

Sharma i col. (1996), descriuen que el fragment que conté aproximadament 6'5Kb de la regió 5' flanquejant del gen *Pdx1* és suficient per dirigir l'expressió d'un gen informatiu en els illots pancreàtics i les cèl.lules duodenals d'un ratolí transgènic. Entre el nucleòtid -6200 i -5670 de la regió 5' flanquejant del promotor de *Pdx1* de rata, existeix un fragment de 530 bp que és extremadament important per l'activitat específica en cèl.lula β (Peshavaria et al. 1997) (Fig.11). Aquest fragment conté un motiu de caixa E, idèntic als del promotor del gen de la insulina. També és reconegut per l'heterodímer format pels factors de transcripció bHLH BETA2/NeuroD (específic de cèl.lula β) i E47 (factor ubicu), que activa l'expressió de *Pdx1* en les cèl.lules β . HNF3 β (*hepatocit nuclear factor 3 β), membre de la família de factors de transcripció *forkhead-wingedhelix*, també es pot unir a aquestes seqüències i activar l'expressió de *Pdx1* cooperant amb BETA2/E47.*

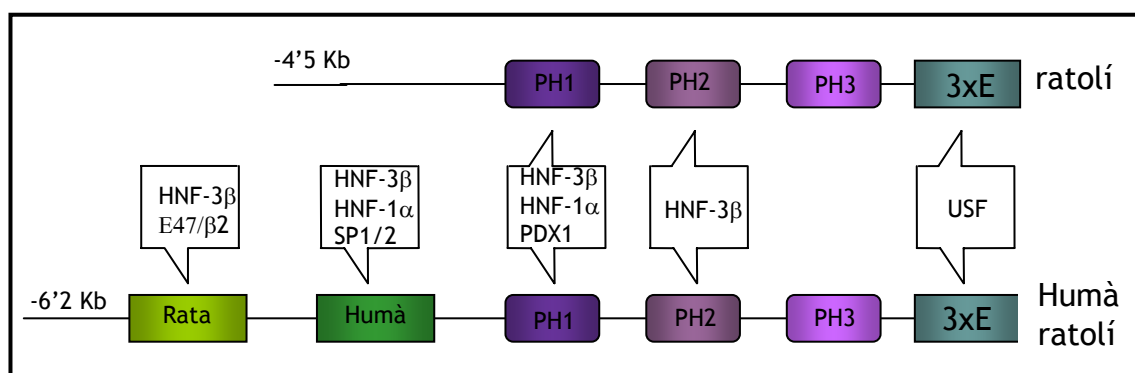
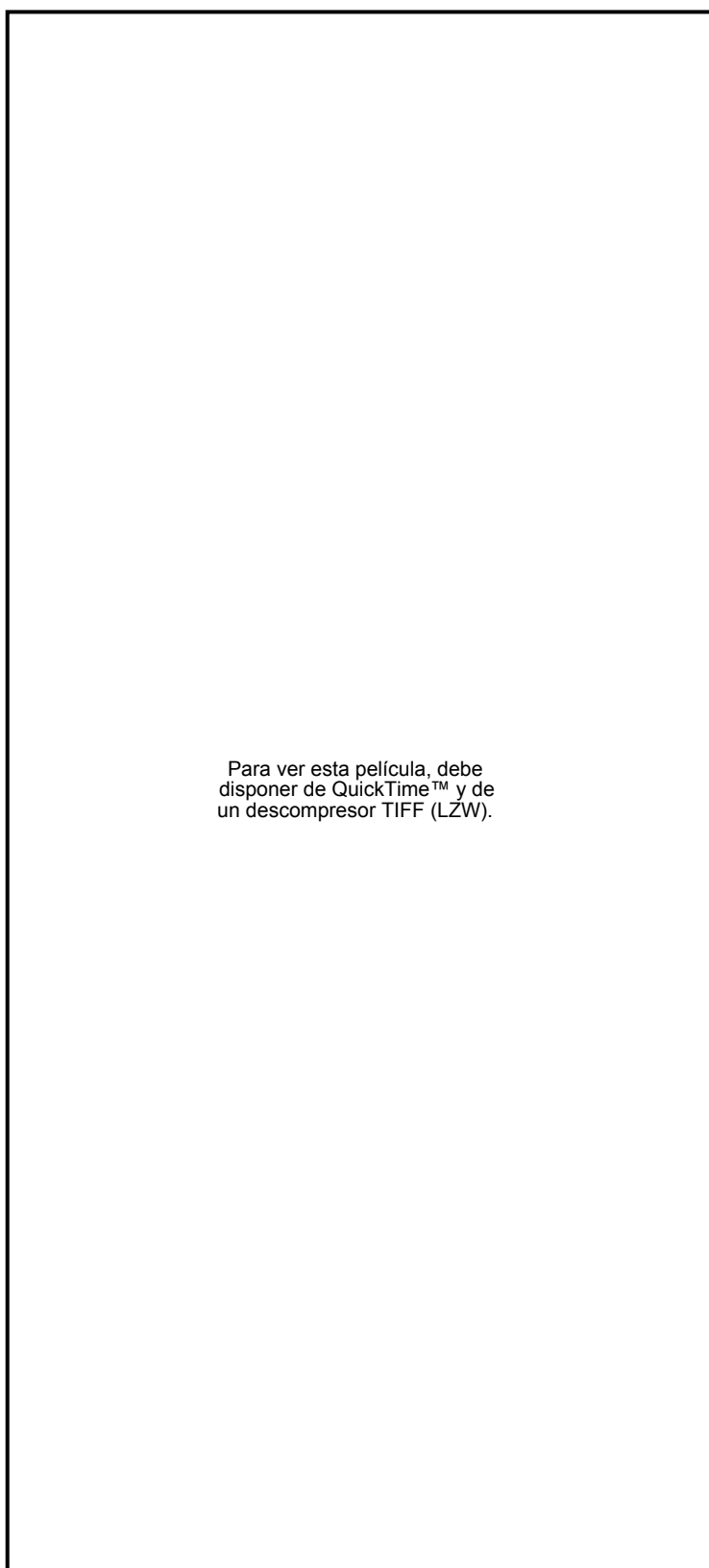


Figura 11. Representació esquemàtica del promotor de *Pdx1* i dels factors de transcripció que s'hi uneixen. En l'esquema humà/ratolí s'hi troben representades les caixes E distals específiques de rata i la caixa E distal específica d'humà.

Utilitzant transfeccions transitòries d'aquests fragments delecionats, es localitzà un altre element promotor que conté un motiu de caixa E entre -3'7 i -3'45 Kb del promotor de *Pdx1* en humà, que provocava una forta estimulació del gen informatiu en totes les línies de cèl.lules β i en canvi, la seva activitat era menor en les línies cel.lulars no β , incloses les cèl.lules productores de glucagó, cèl.lules acinars i cèl.lules hepàtiques. Anàlisis d'aquest fragment per Dnasa I *footprinting* revelen dues regions protegides: una que unia els factors de transcripció SP1 i SP2, i una altra que unia els factors HNF-3 β i HNF-1 α . Aquests factors actuen cooperativament per regular l'activitat transcripcional del gen *Pdx1* (Ben-Shushan et al. 2001).



Elements reguladors conservats entre els gens *Pdx1* humà i de ratolí

Figura 12. Homologia de seqüència en les àrees I, II i III entre els promotors de *Pdx1* de ratolí, humà i pollastre. Les seqüències amb negre són les àrees conservades entre les tres espècies. La numeració correspon al gen *Pdx1* de ratolí. Els llocs A1 i A2 de l'àrea 1 i B de l'àrea 2, fan referència als llocs d'unió per HNF3 β . Extret de (Gerrish et al. 2000).

La caracterització del promotor de ratolí es va dur a terme utilitzant un fragment d'aproximadament 4'5 kb, que recapitulava el patró d'expressió endògen (Wu et al. 1997); (Stoffers et al. 1999); (Gannon et al. 2001). En la seqüència del promotor proximal conservat, es van descriure tres regions d'elevada homologia entre -2'81 i -1'67 kb del gen humà que equival a la regió entre -2'7 i -1'8 kb del gen *Pdx1* de ratolí (Peers et al. 1994). Aquestes regions s'anomenaren PH1, PH2 i PH3 (Fig. 11) (Marshak et al. 2000) o àrees 1, 2 i 3 (Gerrish et al. 2000) (Fig. 12). Cada una d'aquestes regions conservades era capaç de conferir activitat específica de cèl.lula β en experiments de transfeccions transitories, a un promotor heteròleg. Tot i així, les regions PH1 i PH2 presentaven una inducció més elevada en cèl.lula β que en cèl.lules no β (Marshak et al. 2000); (Gerrish et al. 2000). L'absència de PH2 en la regió 5' flanquejant del promotor a pollastre, suggereix que l'expressió del gen *Pdx1* en aus ha de ser diferent que en rossegadors i humans (Gerrish et al. 2000).

Diferents tipus d'estudis funcionals revelen que el factor de transcripció HNF-3 β s'uneix i transactiva les regions PH1 i PH2. En PH1 existeixen dos llocs d'unió per HNF-3 β : A1 i A2. Tot i que mutacions en el lloc d'unió de HNF-3 β en la regió PH2 no modifica l'activitat transcripcional, mutacions en PH1 tenen un efecte important.

La regió PH1 uneix el mateix PDX1 *in vitro* (Marshak et al. 2000) i *in vivo* (Gerrish et al. 2001), suggerint un possible *loop* d'autorregulació (Chakrabarti et al. 2002). També s'ha descrit la unió de HNF-1 α en la regió PH2 (Gerrish et al. 2001). Aquests tres factors actuarien cooperativament per tal de regular la transcripció de *Pdx1* (Fig. 11). Així HNF-3 β , membre de la família de factors de transcripció de la família *forkhead-winged helix*, és un factor important en la regulació de la transcripció del gen *Pdx1* (Wu et al. 1997). Aquest està estructuralment relacional amb la histona H5, que altera l'estructura nucleosomal, obrint l'estructura de la cromatina i permetent l'accés al promotor a d'altres factors de transcripció (Clark et al. 1993); (Shim et al. 1998). HNF-3 β no es troba restringit a les cèl.lules β , fet que indicaria que l'especificitat de cèl.lula vindria donada per la combinació amb d'altres factors. Aleshores, en la regió PH1 s'uneixen membres de la família HNF-1 tals com HNF-1 α i HNF-1 β , que s'hi poden unir com a homodímers o heterodímers (Bach et al. 1991); (Mendel et al. 1991). Experiments de transfeccions transitòries en cultius de fibroblast, demostren que HNF-3 β i HNF-1 α poden activar el promotor distal humà de forma independent, i que actuen sinèrgicament quan són cotransfectats. De fet les mutacions en HNF-1 α representen la forma més freqüent de MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) (Yamagata et al. 1996).

La importància d'aquests dominis conservats *in vivo* es va posar en evidència en estudis amb ratolins transgènics on un fragment de -4'3 a -1'88 kb i que inclou les àrees PH1 i PH2, era capaç de dirigir l'expressió del transgen únicament i específicament, en les cèl.lules dels illots pancreàtics (Wu et al. 1997); (Stoffers et al. 1999); (Gannon et al. 2001). En canvi una regió més petita que continua contenint les regions PH1 i PH2 és activa en les cèl.lules dels illots productores d'insulina, de glucagó i de somatostatina, en les cèl.lules de l'esfínter pilòric i en els conductes biliars. Aquest fragment és considerat com el promotor específic endocrí. El

fragment que conté la regió PH3 dirigeix l'expressió del gen informatiu a les cèl.lules productores d'insulina, tot i que aquesta expressió és perd en el pàncrees adult (Gannon et al. 2001). Ha estat proposat que PH3 tingui un paper en les cèl.lules β immadures o que proporcioni senyals del desenvolupament crítiques per la iniciació de la maduració del llinatge de cèl.lula β .

El promotor proximal del gen *Pdx1*

En la regió que va del nucleòtid -190 al -95 del promotor del gen *Pdx1*, existeixen tres motius consens de caixa E, que contenen una seqüència nucli CANNTG. Tot i que al treure dues d'aquestes caixes E en tàndem del nucleòtid -177 no disminueix l'activitat del promotor, la delecció de la caixa E proximal del nucleòtid -104 aboleix completament l'expressió de *Pdx1* en la línia cèl.lular HIT-T15. Aquesta caixa E és reconeguda pel factor nuclear *helix-loop-helix/leucine zipper* USF-1 (Sharma et al. 1996) (Fig. 11). La seva importància queda demostrada en anàlisis mutacionals, on mutacions en aquesta regió no permeten la unió de USF i aboleixen l'activitat del promotor (Qian et al. 1999).

Regulació post-transcripcional de PDX1

Els nivells de PDX1 dins la cèl.lula, així com la seva activació, estan regulats per diferents factors nutricionals i hormonals com són la insulina, la glucosa, TGF β i l'estrès entre d'altres. En resposta als canvis de concentració extracel.lulars de glucosa i insulina, PDX1 és fosforilada, mitjançant la via de la PI3-Kinasa, fet que permet la seva translocació des de la perifèria nuclear al nucleoplasma, on serà capaç d'unir-se al DNA i promoure la transcripció de determinats gens (Boam et al. 1990), intervenint així en la regulació dels nivells de glucosa de l'organisme (Fig. 13).

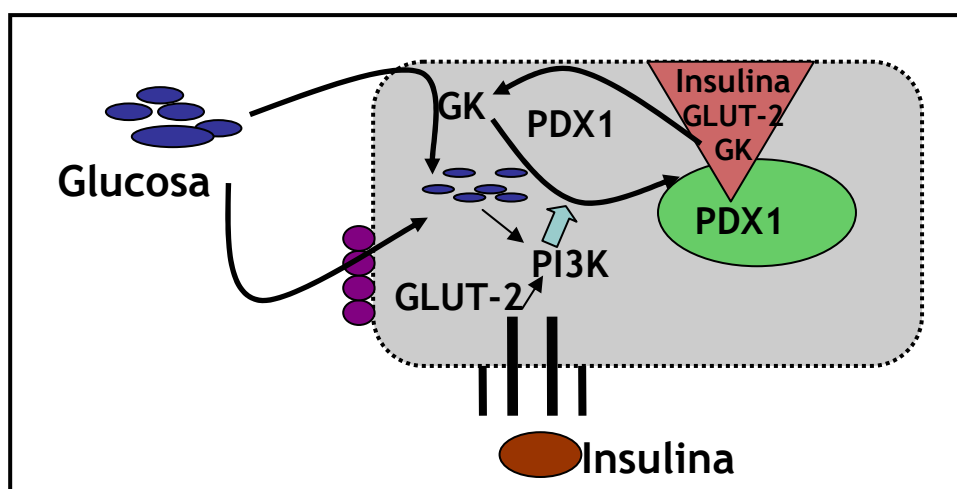


Figura 13. Esquema de la regulació de la translocació nuclear de PDX1 dependent de glucosa. La glucosa per si sola és capaç de provocar la translocació al nucli de PDX1 per la via de la PI3-K. PDX1 un cop translocat al nucli, regula l'expressió de GLUT2, insulina i GK, intervenint així en la capacitat de resposta de les cèl.lules β enfront al canvi de concentració de glucosa en el medi. Adaptat de (Hui and Perfetti 2002).

2.3.2. Diabetis mellitus

La diabetis mellitus és un grup heterogeni de malalties metabòliques caracteritzades per hiperglicèmia, que si no són tractades adientment, poden desembocar en altres malalties com la ceguesa, disfuncions dels ronyons i del sistema nerviós perifèric i una esperança de vida reduïda.

Es tracta del desordre metabòlic més prevalent arreu del món, afectant 150 milions de persones, i incrementant ràpidament en determinades poblacions; la incidència més elevada es dona en els països desenvolupats.

Segons la causa que la provoca es poden distingir dos tipus de diabetis:

Diabetis de tipus 1. També s'anomena diabetis depenent d'insulina (IDDM) o juvenil, deguda a una destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β i que afecta el 10% del total d'individus diabètics. S'ha mapat un gen major de susceptibilitat a la regió HLA del cromosoma 6 (Qian et al. 1999).

Diabetis de tipus 2 o NIDDM és la forma més comuna de diabetis, afectant un 90% dels individus que pateixen aquesta malaltia; afecta d'un 10-20% de la població major de 45 anys en molts països desenvolupats. Es caracteritza per diferents graus de resistència a la insulina i disfunció de les cèl·lules β , desembocant en una hiperglicèmia. Diferents esdeveniments moleculars poden estar implicats en la malaltia, incloent mutacions en un sol gen que afecten la capacitat de les cèl·lules β de secretar insulina, o la capacitat del múscul, teixit adipós i les cèl·lules del fetge de respondre a l'acció de la insulina.

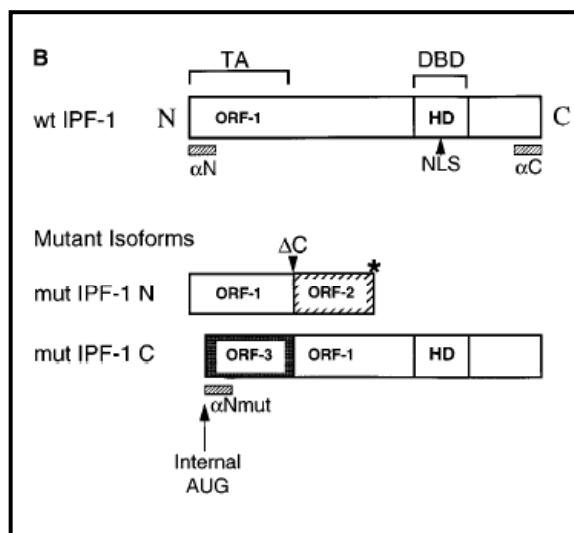
La MODY (*Mature Onset Diabetis of the Young*) és una malaltia genètica complexa que es caracteritza per una herència autosòmica dominant i defectes en la secreció d'insulina, causant una aparició primerenca de NIDDM, normalment abans dels 25 anys i freqüentment durant la infància o l'adolescència (Fajans et al. 2001); (Bell and Polonsky 2001).

Mutacions a diversos gens són responsables de l'aparició de MODY. Els individus amb mutacions en el gen de la glucocinasa (MODY2) presenten una hiperglicèmia lleugera després de menjar, durant tota la seva vida, però rarament necessiten medicació o desenvolupen complicacions microvasculars. La principal patologia és la disfunció de les cèl·lules β , caracteritzada per una disminució de la sensibilitat pancreàtica a la glucosa. Pacients amb mutacions a HNF1 α (MODY3) presenten una tolerància normal a la glucosa mentre són infants, i comencen a presentar símptomes de diabetis en l'adolescència o ben aviat a l'edat adulta. Presenten una hiperglicèmia creixent, necessiten tractament i sovint presenten complicacions microvasculars. Tot això, la malaltia és deguda a una progressiva disfunció de les cèl·lules β del pàncrees, que representa una incapacitat per augmentar la secreció d'insulina en resposta als nivells de glucosa en l'organisme. Mutacions a HNF-4 α (MODY1), HNF-1 β (MODY5) i Pdx1 (MODY4) presenten una clínica similar a HNF-1 α . Darrerament s'han descrit: la MODY6, provocada per una mutació en el gen *Beta2/NeuroD*, una malaltia molt poc freqüent i amb manifestacions clíniques poc descrites (Velho et al. 2003) i la MODY7, provocada per mutacions en *islet (Isl)-1* (revisat en (Iwasaki 2001)).

MODY4 Al 1997 es descrivia Pdx1 com un nou locus genètic provocant MODY, a la qual s'anomenà MODY4 (Stoffers et al. 1997). La primera observació que Pdx1 podia estar associat amb la diabetis de tipus 2 es va fer en estudis d'un nen a qui es va diagnosticar, per autòpsia, agènesi pancreàtica, després d'haver sobreviscut 18 dies. Observaren que aquest fenotip era

causat per una mutació inactivant en homozigosi en la seqüència codificant de l'exó 1 de *Pdx1* (pro63fsdelC). Aquesta mutació originava un trencament prematur de la proteïna, a la que li faltava l'homeodomini necessari per a la unió a DNA i la seva localització nuclear. El subjecte formava part d'un *pedigree* familiar on els portadors en heterozigosi presentaven una forma de diabetis de tipus 2 (MODY), d'herència autosòmica dominant (Fig. 14).

Figura 14. Descripció esquemàtica de les isoformes de IPF1 (PDX1) mutades (mut IPF1 N i mut IPF1 C) i les pautes de lectura oberta (ORF-1, -2 i -3). La posició dels pèptids sintètics contra els que es van obtenir els antiserums NH2 i COOH terminals s'indiquen amb barres puntejades (N, C i N mut). TA, domini de transactivació; DBD, domini d'unió al DNA; HD, homeododomini; NLS, senyal de localització nuclear. ΔC marca la posició de Pro63fsdelC. Extret de (Stoffers et al. 1997).



Aquesta mutació consistia en una delecció d'una citosina en una seqüència de sis citosines que codifiquen per un domini de poliprolina. Els dominis de poliprolina en els factors de transcripció són dominis essencials de transactivació. Així doncs, la disrupció del domini de transactivació invalida la funció transactivacional de *Pdx1*. Mutacions en el gen *Pdx1* dificultarien la capacitat de les cèl.lules β per adaptar-se a les creixents demandes imposades per l'edat. La funció defectiva de *Pdx1* podria resultar en un creixement anormal de les cèl.lules β , disminució de l'expressió de la insulina en resposta a la inducció per glucosa i una anormal expressió de les molècules sensibles a la concentració de glucosa, com GLUT2 i glucocinasa. Donat que aquesta patogènesi es produïa en heterozigosi, seria degut a un efecte d'haploinsuficiència de *Pdx1* o un mecanisme de dominància negativa.

La mutació descrita en aquestes famílies és de gran interès per entendre la funció de *Pdx1*, ja que pot generar dues isoformes de la proteïna (Stoffers et al. 1998). Una isoforma detectable amb un anticòs contra la regió N-terminal de *Pdx1*, present en el citosol, que conté el domini de transactivació amino terminal intacte (ORF-1) i un segment adicional de 59 aminoàcids (ORF-2), però ha perdut l'homeodomini i la senyal de localització nuclear i per tant, queda retinguda en el citoplasma (Fig. 14). La segona isoforma conté la regió carboxi-terminal i utilitza un codó intern fora de pauta per generar una tercera pauta de lectura (ORF-3). Aquesta pauta de lectura es solapa amb la pauta de lectura de la proteïna salvatge en el lloc on hi ha hagut la delecció de la citosina, generant així una proteïna que conté el domini d'unió al DNA i el senyal de localització nuclear, però no el domini de transactivació. Aquesta isoforma actua per dominància negativa, ja que reté les funcions d'unió al DNA, però no té el domini de

transactivació, interferint així amb la proteïna salvatge PDX1. Aquestes dades indiquen que mutacions en *Pdx1* en la diabetis de tipus 2 poden actuar mitjançant efectes de dominància negativa sobre la transcripció del gen de la insulina i d'altres gens de les cèl.lules β que són regulats per *Pdx1* (Fig. 14).

Des d'aleshores, altres mutacions de *Pdx1* han estat descrites a diverses famílies franceses, britàniques i sueques amb diabetis de tipus 2, tant d'aparició primerenca com tardana. Sis d'aquestes eren mutacions de canvi d'aminoàcid: C18R, Q59L, D76N, R197H, G212R i P239Q i una era la inserció d'una prolina en la posició 243. Totes aquestes mutacions semblen afectar la capacitat de PDX1 per regular la transcripció del gen de la insulina, fent que hi hagi una resposta malmesa a la glucosa oral (Fig. 15).

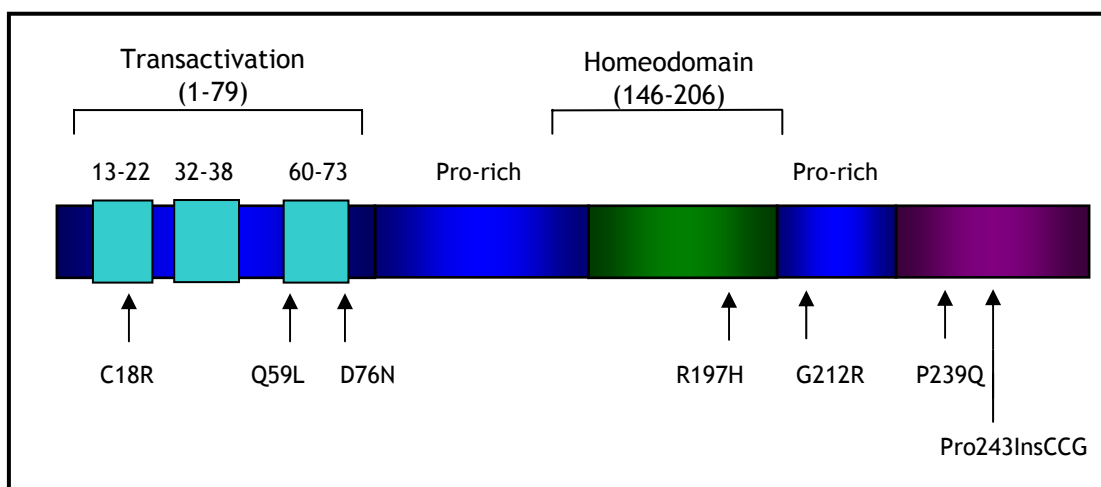


Figura 15. Esquema de mutacions en *Pdx1* identificades en pacients amb diabetes de tipus 2 primerenca i tardana. Adaptat de (Docherty 2001).

3. EL PÀNCREES

El pàncrees és un derivat endodèrmic que presenta cèl.lules exocrines, endocrines i conductes de secreció (Fig. 16). El 90% del pàncrees el formen les cèl.lules exocrines, que produeixen enzims digestius tals com proteases, amilases, lipases i nucleases, secretades al duodè a través dels conductes. La secreció d'aquests enzims digestius és regulada per hormones com la secretina, colecistoquinina i gastrina, així com per estímuls neuronals. Els illots endocrins estan formats per quatre tipus cel.lulars diferents: α , β , δ i PP, que produeixen glucagó, insulina, somatostatina i polipèptid pancreàtic respectivament. Aquests illots pancreàtics estan formats per un nucli de cèl.lules β , que queda emboltat pels altres tipus cel.lulars. Encara ara, es coneix poc sobre els factors de transcripció que intervenen en la formació, el desenvolupament i la diferenciació del pàncrees. Tot i això, està clar que senyals enviats entre l'endoderm i el mesoderm i el contacte cèl.lula-cèl.lula són importants per la formació dels illots pancreàtics (Bramblett et al. 2000); (Itkin-Ansari et al. 2000); (Kim KS 2001).

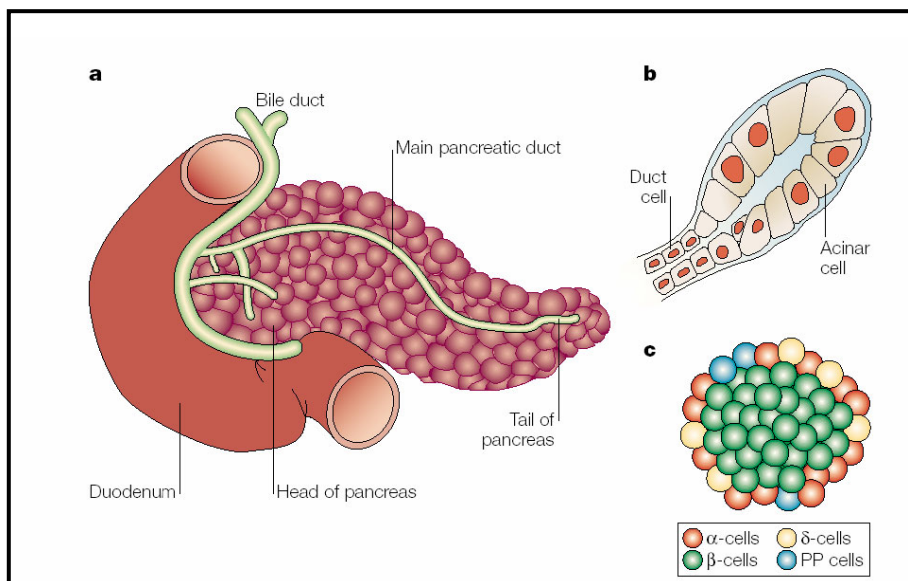


Figura 16. a) El pàncreas madur es troba adjacent al duodè. b) La funció del pàncreas exocrí (cèl.lules acinars) és la producció enzims digestius que aniran a parar al tracte intestinal. c) Illots del pàncreas endocrí. Extret de (Edlund 2002).

3.1. Senyalització en l'especificació del pàncrees presumptiu

Els estadis inicials del desenvolupament pancreàtic tenen lloc durant l'embriogènesi primerenca, però encara no es coneixen molts dels factors de transcripció que hi estan implicats. Aquest procés depèn d'una xarxa gènica de factors de transcripció i molècules de senyalització, subjectes a una localització, un temps i una duració específics (Slack 1995).

Durant l'embriogènesi, el pàncrees es forma a partir de l'endoderm de l'intestí anterior primitiu, en l'àrea que donarà lloc al duodè, en una decisió que determinarà, bé cap a fetge, bé cap a pàncrees, el dia E8'0-8'5 (Slack 1995); (Deutsch et al. 2001). De fet, aquesta especificació es dona de forma independent en dos grups de cèl.lules, que s'engruixen, constituint els primordis dorsal i ventral del pàncrees. Aquests primordis segueixen programes de desenvolupament que no són completament idèntics i que són lleugerament asincrònics, fins que es fusionaran per donar lloc a un únic òrgan pancreàtic (Fig. 17). *Pdx1*, un dels gens marcadors de pàncrees d'expressió primerenca, comença a detectar-se el dia E8'5 en la regió dorsal de l'intestí. En el ratolí, apareix el primordi dorsal en el dia embrionari 9'5 (E9'5), mentre que el primordi ventral apareix un dia després. També és el moment on apareixen les primeres cèl.lules α secretores de glucagó. A E10'5 apareixen les primeres cèl.lules β , productores d'insulina, seguides per (aproximadament a E15'5) les cèl.lules secretores de SST i en el naixement, per les cèl.lules PP, secretores del PP (Slack 1995). Quan es dona la rotació de l'estómac i el duodè, el primordi ventral i l'orifici hepatopancreàtic es mouen, fins a fusionar-se per formar el pàncrees a E17. En el pàncrees adult, l'expressió de *Pdx1* queda restringida a les cèl.lules β i δ (Edlund 2001).

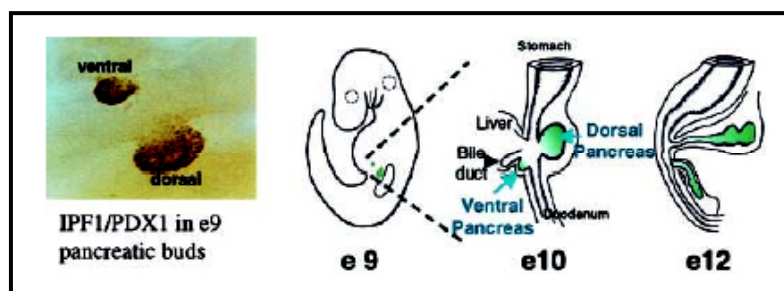
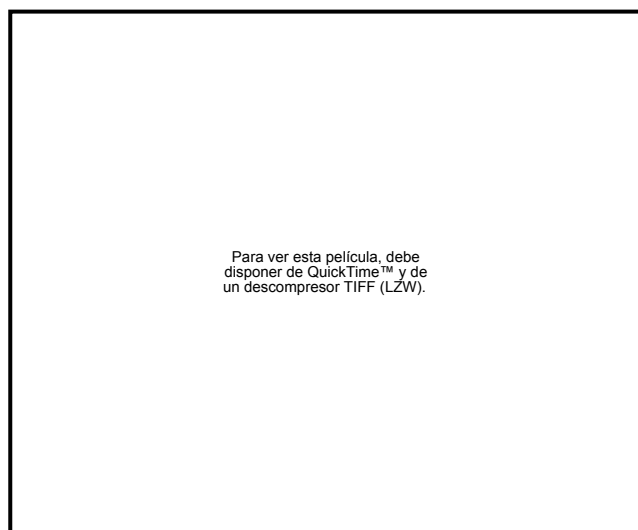


Figura 17. El desenvolupament pancreàtic comença amb l'evaginació de l'endoderm de l'intestí primitiu que formarà els primordis pancreàtics dorsal i ventral (E9). *Pdx1* és un dels marcadors inicials en aquests estadis. Els dos primordis creixeran, es ramificaran i es fusionaran en E13-14 per formar el pàncreas definitiu. Extret de (Edlund 2001).

Durant el desenvolupament del pàncrees, són crucials els senyals que provenen de les capes germinals adjacents. Els factors de creixement del mesoderm *fibroblast growth factors* (FGFs) funcionen com a molècules de senyalització importants en la regulació del desenvolupament (Fig. 18). Aquestes proteïnes estan involucrades en la formació del patró, la proliferació i diferenciació cel.lular de molts òrgans derivats de l'endoderm, inclòs el pàncrees (Hart et al. 2000). El ratolí mutant nul per *Fgf10* presenta hipoplàsia pancreàtica, tant ventral com dorsal, com a resultat de la disminució de la proliferació epitelial (Bhushan et al. 2001). També són importants per al desenvolupament del pàncrees els *epidermal growth factors* (EGF) - factors de creixement epidèrmics-, secretats també pel mesènquima i que promouen la proliferació epitelial *in vitro* (Fig. 18) (Cras-Meneur et al. 2001), ja que els ratolins mutants nuls pel seu receptor presenten una disminució moderada del creixement pancreàtic (Miettinen et al. 2000).

Figura 18. Esquema de la senyalització mesènquima/epiteli. La senyalització del mesènquima pancreàtic cap a l'epiteli es dona per secreció de factors de creixement de les famílies com FGF, HGF i EGF. Durant la vasculogènesi, les cèl.lules del mesènquima es diferencien en vasos intrahepàtics i les cèl.lules epitelials pancreàtiques en els diferents tipus cel.lulars del pàncreas. Extret de (Jensen 2004).



Anterior a l'especificació cap al destí pancreàtic dorsal, l'epiteli de l'intestí posterior és troba adjacent a la notocorda, una estructura axial mesodèrmica (Slack 1995) (Fig. 19). La notocorda secreta factors moleculars com l'*actina-betaB* (membre de la família de factors de

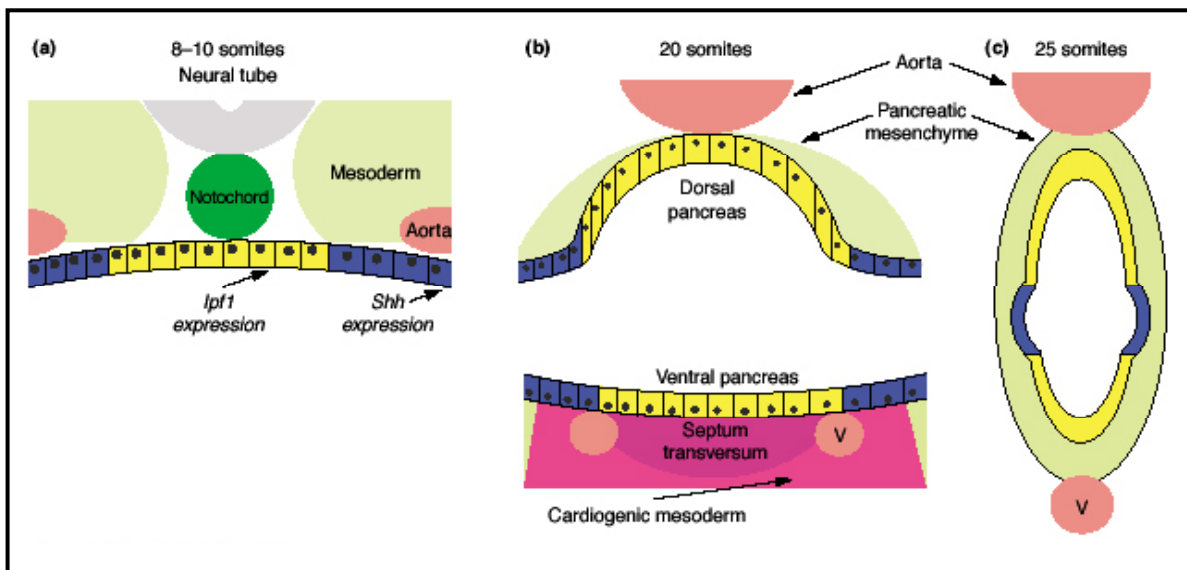


Figura 19. Les senyals inductives que provenen de les interaccions entre els teixits derivats a l'endoderm i el mesoderm de l'intestí anterior promouen el desenvolupament pancreàtic. a) E8,0 a notocorda es troba en contacte directe amb l'endoderm del pàncreas dorsal presumptiu, permeten l'expressió de *Pdx1* (groc). L'endoderm lateral expressa *Shh* (blau) però no *Pdx1*. També estan representats el mesoderm paraxial i l'aorta dorsal. b) E8,5-9,0 es forma el primordi pancreàtic dorsal i el primordi pancreàtic ventral presumptiu. L'endoderm del pàncreas ventral contacta amb el *septum transversum* i expressa *Pdx1*, mentre que l'endoderm hepatogènic contacta amb el mesoderm cardíac i expressa *Shh* però no *Pdx1*. De l'endoteli dels vasos sanguinis (v) provenen senyals intercel·lulars que promouen l'expressió de gens pancreàtics en l'endoderm adjacent. c) E9,5 les cèl·lules mesenquimàtiques derivades del mesoderm envolten el primordi pancreàtic dorsal i ventral, que es troben separats per l'epiteli duodenal que expressa *Shh*. Extret de (Kim et al. 2002).

creixement transformadors $TGF\beta$ (*Transforming growth factor*) i $FGF2$, que condicionen el mesènquima del putatiu pàncrees i activen l'expressió de gens pancreàtics, reprimint-ne la de *Sonic hedgehog* (*Shh*) a la regió dorsal de l'endoderm de l'intestí anterior que està destinat a formar pàncrees (Hebrok et al. 1998). *Sonic hedgehog* (SHH), una proteïna de senyalització intercel·lular i repressor de la formació d'illots i ramificació acinar, és troba absent de l'endoderm pancreàtic; per contra, té un alt nivell d'expressió en l'estómac adjacent i en l'endoderm del duodè. L'exclusió de *Shh* de l'endoderm pancreàtic és essencial per a la iniciació del programa pancreàtic en el ratolí i pollastre. En ratolins transgènics amb expressió ectòpica de *Shh* en l'epiteli pancreàtic presumptiu, s'observa una barreja entre fenotip de pàncrees i duodè (Apelqvist et al. 1997). Aquesta exclusió de *Shh* permet l'evaginació dels primordis pancreàtics. Altres factors, com la proteïna $FGF4$ estan també implicats en l'especificació primerenca de l'endoderm. Alguns resultats han demostrat que $FGF4$ és capaç d'induir l'expressió de gens específics de pàncrees, com *Beta2/NeuroD* i *SST in vitro* (Wells and Melton 2000).

Tant el primordi pancreàtic ventral com el fetge s'originen a partir d'una cèl·lula precursora comuna (Deutsch et al. 2001). Mentre que per defecte, l'endoderm ventral de l'intestí anterior activa la formació de pàncrees, senyals del mesènquima cardíac adjacent (com els $FGFs$) fan que l'endoderm expressi gens que activaran l'organogènesi del fetge, com són els

factores de transcripció nuclear hepàtics (HNFs). SHH apareix com un factor central en aquesta opció bipotencial del precursor comú. *Shh* s'expressa en el mesènquima cardíac, i és essencial per a la morfogènesi de la tràquea, pulmons i esòfag (Chiang et al. 1996); (Litington et al. 1998) però contràriament que en l'endoderm dorsal, l'endoderm ventral no expressa *Shh* per defecte (Deutsch et al. 2001). Així doncs, sembla que el mesoderm cardíac localitzat ventralment, induiria una expressió local de *Shh* que contribuiria a l'exclusió local de desenvolupament del pàncrees (Fig. 19). Altres diferències en el desenvolupament dels primordis dorsal i ventral són degudes a diferències en els seus respectius teixits mesenquimàtics com, per exemple, l'expressió de *Isl-1*, localitzada en el mesènquima dorsal (Ahlgren et al. 1997) i en les diferències temporals en l'aparició de les cèl.lules endocrines en el primordi ventral (Spooner et al. 1970).

Al peix zebra, l'especificació del desenvolupament del pàncrees és diferent que la de pollet i ratolí; l'expressió de *Shh* és necessària per al desenvolupament del pàncrees endocrí i l'expressió d'insulina (Roy et al. 2001), constituint un paradigma senyalitzador semblant al de la regulació de la producció de la insulina proposada per senyals hedgehog en les cèl.lules β pancreàtiques adultes (Thomas et al. 2000).

3.2.Factors de transcripció i desenvolupament pancreàtic primerenc

Al mateix temps que es donen aquests senyals intercel.lulars permisius i directius, un programa selectiu d'expressió gènica defineix el destí del desenvolupament en l'epiteli pancreàtic de l'embrió. Aquest programa utilitza l'activació i repressió de diferents factors de transcripció i es manifesta en dues fases: una que defineix l'inici dels primordis del pàncrees primitiu (transició primària) i una segona fase que dicta el compromís cap a un llinatge exocrí o endocrí (transició secundària). La disrupció de gens diana que codifiquen per diversos factors de transcripció ha demostrat la importància de la regulació del programa de desenvolupament pancreàtic.

Hb9 (codificat per *Hlxb9*), una proteïna amb homeodomini, s'expressa en dues fases del desenvolupament diferents: primer durant l'evaginació dels primordis pancreàtics en E8 i després, durant la diferenciació de les cèl.lules β . En el ratolí nul per *Hlxb9* no es desenvolupa el lòbul dorsal del pàncrees i no s'expressa *Pdx1*. Tot i que el lòbul ventral es desenvolupa, presenta uns illots pancreàtics més petits, amb un nombre reduït de cèl.lules β (Li et al. 1999); (Harrison et al. 1999).

Isl-1, un membre de la família amb homeodomini LIM, esmentat anteriorment, és necessari per a la diferenciació de tots els tipus cel.lulars dels illots (Ahlgren et al. 1997). En el ratolí mutant nul no hi ha presència de cèl.lules endocrines i no es desenvolupa el primordi pancreàtic dorsal, reflectint part de l'efecte del ratolí *knockout* (KO) de *Hlxb9*. *Isl1* també és requerit a les cèl.lules dels illots diferenciades; aquest requeriment secundari complica el mapa del desenvolupament del pàncrees a nivell molecular, particularment en els estudis de KO, on la interrupció de la funció inicial provoca letalitat embrionària.

Recentment, s'ha suggerit que PBX1, un factor de transcripció amb homeodomini, membre de la classe TALE (3 amino acid loop extension), també és essencial per al correcte desenvolupament i funcionament del pàncrees (Liu et al. 2001). *Pbx1* s'expressa a l'epiteli pancreàtic i al mesènquima que l'embolta (Kim et al. 2002). Els embrions *Pbx1* *-/-* presenten hipoplàsia pancreàtica i defectes en la diferenciació de les cèl.lules exocrines i endocrines abans de morir en E15. En aquest embrions l'expressió de *Isl1* està reduïda. Els adults *Pbx1* *+/-* presenten malformacions en els illots i hipoinsulinèmia (Kim et al. 2002). S'ha descrit que PBX1 i PDX1 formen un complex per a la regulació de la transcripció del gen SST (Peers et al. 1995). És possible doncs que a través de la seva interacció amb PDX1, PBX1, un factor de transcripció més general, jugui un paper important en els estadis inicials del desenvolupament pancreàtic en l'embrió (Dutta et al. 2001).

3.3. Senyalització en l'especificació dels compartiments exocrí i endocrí

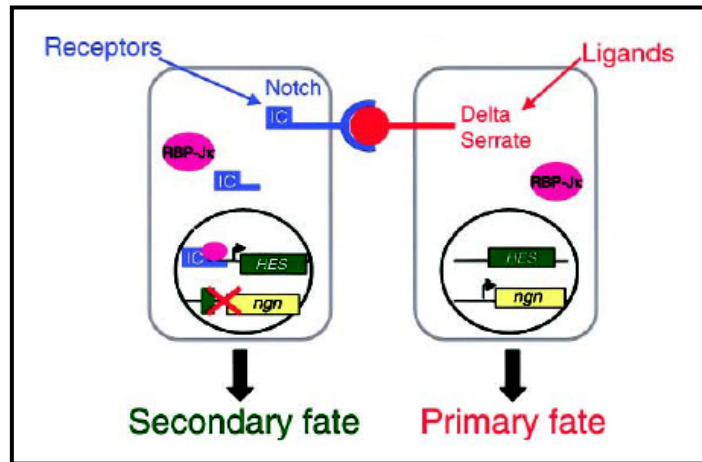
Després de la formació dels primordis pancreàtics dorsal i ventral, l'epiteli pancreàtic prolifera, envaint el mesènquima del voltant; els primordis roten i es fusionen per formar el pàncrees definitiu. Senyals intercel.lulars mitjançats per TGF β , hedgehog i Notch són importants per tal de crear un límit molecular en l'epiteli i proporcionar condicions permissives per l'expansió i l'organogènesi pancreàtica. Senyals del mesènquima cap a l'epiteli invasor regularien el balanç apropiat entre el desenvolupament exocrí i endocrí (Gittes et al. 1996).

Tant en l'epiteli com en el mesènquima pancreàtic, s'expressen agonistes i antagonistes de la senyalització de TGF β . Els agonistes com l'activina i TGF β 1, promouen el desenvolupament de les cèl.lules endocrines *in vitro* (Sanvito et al. 1994). En el ratolí transgènic tant la sobreexpressió del dominant negatiu, com de la forma constitutivament activa del receptor de l'activina, provoca una hipoplàsia dels illots (Yamagata et al. 1996); mentre que la sobreexpressió de la forma dominant negativa del receptor TGF β II altera la diferenciació i proliferació de les cèl.lules acinars (Bottinger et al. 1997). En canvi antagonistes com la follistatina promouen la diferenciació embrionària de les cèl.lules exocrines i inhibeixen el desenvolupament endocrí en cultiu (Miralles et al. 1998). Per tant, és necessari un equilibri en la senyalització entre la follistatina i els factors de diferenciació, activina, TGF β 1, per tal d'aconseguir una taxa equilibrada de teixit exocrí i endocrí en el pàncrees (St-Onge et al. 1999).

La senyalització per Notch governa el destí cel.lular durant el desenvolupament del pàncrees. Aquesta senyalització regularia el destí de cèl.lules exocrines i endocrines, mimetitzant un mecanisme que es dona durant el desenvolupament neural, anomenat inhibició lateral (Artavanis-Tsakonas et al. 1999) (Fig. 20). En les crestes neurals, l'expressió dels factors de transcripció *basic helix-loop-helix* (bHLH) com les neurogenines (*ngn*) fan que s'expressin lligands extracel.lulars com delta (*dl*), serrate (*ser*) i *jagged* a les cèl.lules precursors neuronals que activen el receptor Notch de les cèl.lules adjacents, que transdueixen el senyal, activant la transcripció dels gens *hes*. Aquests gens codifiquen per factors bHLH, que funcionen reprimint

l'expressió de *ngn* i altres gens diana, no permetent la diferenciació neuronal de les cèl.lules adjacents als neuroblasts que es desenvolupen (Fig. 20).

Figura 20. La senyalització per Notch es dona entre cèl.lules adjacents, per senyalització mitjançant receptors ancorats a la membrana, codificats pels gens *Notch*, i els lligands codificats per *Delta* i *Serrate*. L'activació lligand-receptor, fa que la part intracel.lular del receptor (IC) sigui alliberada i pugui translocar-se a nucli, on al seu torn, via el factor de transcripció RBP-J, activa l'expressió dels gens *Hes*, els quals codifiquen per repressors bHLH que, al seu torn, reprimeixen *ngn3*, impedit la diferenciació. Extret de (Edlund 2001).



En definitiva, el model d'inhibició lateral proporciona un mecanisme pel qual la cèl.lula que es diferenciarà en cèl.lula del llinatge endocrí (positiva per *ngn*) inhibeix les seves cèl.lules veïnes, forçant-les a adoptar un destí no-endocrí, és a dir, exocrí o de cèl.lula dels conductes. En la generació del pàncrees, el gen *neurogenina 3* (*Ngn3*) és necessari per al desenvolupament del llinatge cel.lular pancreàtic endocrí (Gradwohl et al. 2000) i ha estat designat com un marcador de cèl.lules precursors dels illots (Sander et al. 2000). La sobreexpressió de *Ngn3* en el desenvolupament del pàncrees provoca una diferenciació accelerada de les cèl.lules progenitores endocrines (Sander et al. 2000); (Apelqvist et al. 1999). Així *Hes1* es troba absent de les cèl.lules endocrines d'acord amb aquest model, i el ratolí KO pateix una ràpida disminució de les cèl.lules precursors, resultant en un desenvolupament precoç de les cèl.lules endocrines (Jensen et al. 2000). El ratolí deficient pel lligand *delta like-1* (*dll1*) presenta una diferenciació accelerada de les cèl.lules epitelials pancreàtiques que expressen *Ngn3* (Apelqvist et al. 1999), i una sobre expressió de *dll1* en l'intestí del ratolí salvatge, suggerint l'existència d'un fenomen de retroalimentació entre els dos. Tot i així, molts autors no estan d'acord amb aquest model d'inhibició lateral, degut a la falta d'agrupació de les cèl.lules endocrines en absència de *Hes1* (Apelqvist et al. 1999) (Fig. 21).

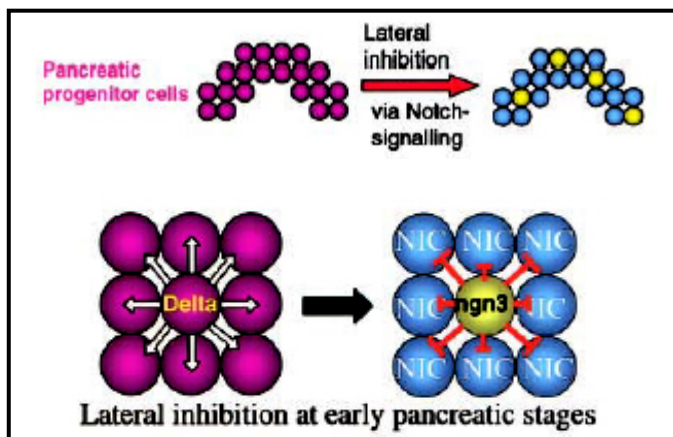


Figura 21. L'especificació de les cèl.lules endocrines del pàncreas a partir d'un pool de cèl.lules progenitores té lloc via inhibició lateral implicant la via de senyalització per Notch, en la qual *ngn3* actua com un gen proendocrí. Modificat de (Edlund 2001).

3.4. Diferenciació de les cèl.lules endocrines

La diferenciació del pàncrees comença en les cèl.lules epitelials que expressen *HNFs*, *Hb9* i *Pdx1*. Després d'aquest estadi inicial de desenvolupament pancreàtic, *Isl1* i *Beta2/NeuroD* indueixen la diferenciació de les cèl.lules epitelials a cèl.lules precursors endocrines i *HNF6* indueix *HNF3 β* , que transactiva l'expressió de *Pdx1*, i també *neurogenina 3 (Ngn3)* (Jacquemin et al. 2000). L'expressió de *Ngn3* comença el dia E9 en el primordi pancreàtic i la seva expressió incrementa fins a un pic el E15'5 durant l'onada més gran de gènesi de cèl.lules endocrines, i disminueix en el naixement, amb poca o nul.la expressió de *Ngn3* en el pàncrees adult.

Tot i que *Ngn3* és necessari i suficient per dirigir el programa de diferenciació de les cèl.lules dels illots durant el desenvolupament, s'ha de remarcar que l'activitat dels factors de transcripció específics que regulen els elements *cis* en la regió del promotor del gen *Ngn3*, dicten el destí endocrí de la cèl.lula col.lectivament. En la regió distal del promotor del gen *Ngn3*, ha estat recentment identificat un *cluster* per dianes d'unió a *HNF1 α* , *HNF3 β* i *HNF6* (Lee et al. 2001). La disrupció d'aquests gens durant el desenvolupament de l'embrió, afecta la progressió del desenvolupament pancreàtic primerenc i l'especificació endocrina. El ratolí homozigot per una disrupció en el gen *Hnf1 α* presenta uns illots petits i una reduïda secreció d'insulina (Pontoglio et al. 1998). Al ratolí nul per *Hnf3 β* li manca l'intestí anterior (Ang and Rossant 1994); (Weinstein et al. 1994), i en l'embrió de ratolí amb manca d'expressió de *Hnf6* hi ha una reducció de la diferenciació de cèl.lules endocrines, a més d'una severa disminució dels nivells d'expressió de *Ngn3* (Jacquemin et al. 2000). Tot i així, l'expressió independent dels factors HNF no sembla ser suficient per a l'expressió de *Ngn3*, sinó que més aviat existeix un mecanisme de cooperació entre aquestes proteïnes accessòries per a l'activació restringida de tipus cel.lular del promotor de *Ngn3* (Lee et al. 2001). *Hes1* reprimeix l'expressió de *Ngn3* unint-se a diversos llocs silenciadors localitzats prop del lloc d'inici de la transcripció (Lee et al. 2001), i així suprimeix el patró precursor endocrí a través de la senyalització per Notch.

Ngn3 indueix l'expressió de *Beta2/NeuroD* i *Hes1* (Apelqvist et al. 1997); (Schwitzgebel et al. 2000); (Huang et al. 2000). *BETA2/NeuroD* també és requerit per la diferenciació de les cèl.lules endocrines, ja que és necessari per completar la diferenciació dels diferents tipus de cèl.lules endocrines (Lee et al. 1995). El ratolí homozigot per a la mutació nula té una important reducció en el nombre de cèl.lules endocrines -de manera més evident en la població de cèl.lules β - i mor al cap de 3-6 dies després de néixer, a causa d'una hiperglicèmia (Naya et al. 1997). La sobreexpressió de *Beta2/NeuroD* provoca una diferenciació primerenca de les cèl.lules endocrines (predominantment de les cèl.lules α).

Per altra banda, *HES1* és un inhibidor de la diferenciació de les cèl.lules endocrines que actua reprimint l'expressió de *Beta2/NeuroD* mediada per *Ngn3*. L'expressió de *Hes1* no era detectada en les cèl.lules α , i el ratolí mutant presenta hipoplàsia pancreàtica amb un major nombre de cèl.lules que expressen glucagó (Jacquemin et al. 2000). Aquestes dades suggereixen que *Hes1* juga un paper important en el manteniment del *pool* precursor de cèl.lules

pancreàtiques durant el desenvolupament i que la hipoplàsia pancreàtica és deguda a la diferenciació prematura de les cèl.lules endocrines amb una reducció de les cèl.lules precursors pancreàtiques.

3.5.Factors de transcripció que intervenen a la diferenciació de les cèl.lules dels illots

Les cèl.lules del pàncrees es diferencien a partir d'una cèl.lula progenitora comuna que expressa *Pdx1* (Fig. 22). Després, les cèl.lules que expressaran *Hes1* queden determinades a un destí cel.lular exocrí, i les que expressen *Ngn3* a un destí endocrí. Aquestes últimes segueixen una cascada temporal de canvis de senyalització, controlada per un canvi específic de l'expressió de factors de transcripció, per acabar generant quatre tipus cel.lulars endocrins: α , β , δ i PP que secreten glucagó, insulina, somatostatina i polipèptid pancreàtic respectivament. Es coneixen alguns factors que intervenen en aquesta cascada de diferenciació, que no s'ha d'entendre com un procés líneal:

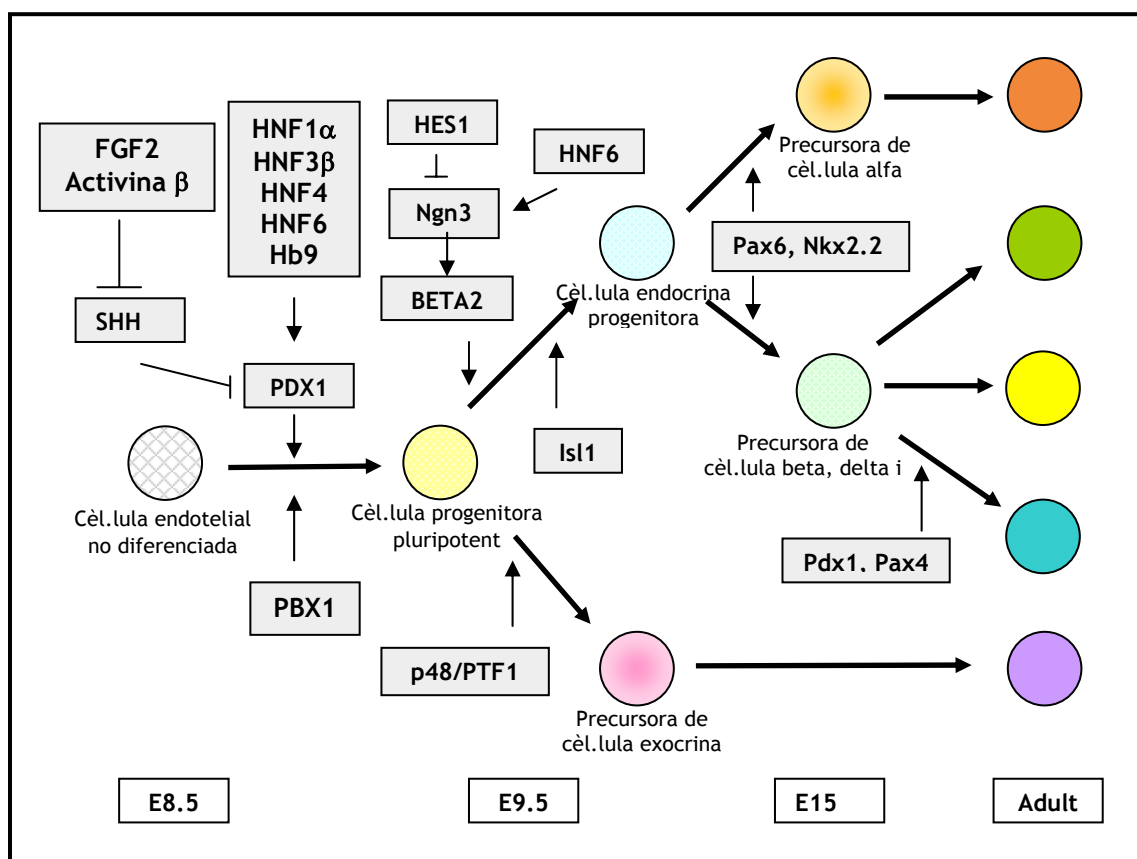


Figura 22. Model de llinatge cel.lular pancreàtic. Factors de transcripció involucrats en el desenvolupament del pàncrees i la diferenciació cel.lular específica. Adaptat de (Ashizawa et al. 2004).

3.5.1.NKX2.2 pertany a la classe de proteïnes NK amb homeodomini. S'expressa en l'embrió entre E8'5-9'0 tan en l'epiteli dorsal com ventral (Edlund 1998). En E9'5 després de la seva expressió en el primordi pancreàtic, comença a quedar restringida a les cèl.lules α , β i PP

dels illots madurs, sense expressió en les cèl.lules δ (Sussel et al. 1998). Els ratolins mutants presenten una acumulació de cèl.lules β no diferenciades completament en estadis tardans del desenvolupament pancreàtic i moren degut a hiperglicèmia (Jorgensen et al. 1999); (Watada G 2000). Aquests ratolins també presenten una disminució en el nombre de cèl.lules α i PP.

3.5.2.NKX6.1 és un altre membre de la classe NK de proteïnes amb homeodomini. En el pàncrees madur només s'expressa en les cèl.lules β , i la seva disrupció en el ratolí mutant provoca una inhibició de la formació de cèl.lules β durant la transició secundària, moment en el què es produeixen la major part d'aquestes cèl.lules (Sander et al. 2000).

3.5.3.PAX4 és una proteïna amb homeodomini i un domini *paired*, necessària per a la diferenciació de les cèl.lules β i δ . El ratolí mutant nul per aquest gen mor al cap de 3 dies del seu neixament i presenta una absència de cèl.lules β i δ i un augment en el nombre de cèl.lules α (Sosa-Pineda et al. 1997).

3.5.4.PAX6 és també una proteïna amb homeodomini i un domini *paired* que s'expressa en els últims estadis del desenvolupament pancreàtic, augmentant la seva expressió en les cèl.lules precursoras endocrines. *Pax6* és essencial per a la diferenciació de totes les cèl.lules endocrines a diferents nivells. El ratolí mutant nul per aquest gen presenta poques o cap cèl.lules α i una reducció important dels altres tipus cel.lulars presents en els illots (St-Onge et al. 1997); (Sander et al. 1997). La proteïna PAX6 és necessària per a la diferenciació final de les cèl.lules α secretores de glucagó. El ratolí doble mutant per *Pax4* i *Pax6* no desenvolupa cèl.lules endocrines madures de cap tipus (St-Onge et al. 1997).

3.5.5.ISL1 L'estudi de *Isl1* en la diferenciació de les cèl.lules endocrines queda emmascarat en el ratolí nul per *Isl1*, ja que aquest és necessari per a la formació del mesènquima pancreàtic dorsal i el ratolí mor en E9'5. Al ratolí salvatge *Isl1* exerceix un paper essencial en la diferenciació de les cèl.lules dels illots, però no és necessari per a la diferenciació de les cèl.lules exocrines (Ahlgren et al. 1997).

3.5.6.PDX1 El ratolí KO per a l'expressió de *Pdx1* presenta agenèsis pancreàtica i, per això, es fa difícil conèixer la funció de *Pdx1* durant els estadis més tardans del desenvolupament pancreàtic. Per examinar amb més detall la seva expressió durant el desenvolupament del pàncrees, és va induir l'inactivació específica de *Pdx1* en cèl.lules β utilitzant el sistema *Cre-lox* (Ahlgren et al. 1998). Aquest estudi va posar en evidència el paper essencial de *Pdx1* en el manteniment del fenotip de la cèl.lula β , activant els gens de la insulina, IAPP i Glut-2, així com reprimint l'expressió del glucagó. Aquestes dades indiquen que l'expressió a nivells normals de *Pdx1* en les cèl.lules β és essencial per a mantenir l'homeostasi de la glucosa (Ahlgren et al. 1998); (Dutta et al. 1998); (Thomas et al. 2001).

3.5.7.HNFs Els factors de transcripció de la família HNF estan implicats en la regulació de *Pdx1* i *Ngn3* i, per tant, són factors importants en el desenvolupament pancreàtic. Com a punt

interessant, cal remarcar que mutacions en tres dels sis gens causants de la diabetis monogènica (MODY) s'atribueixen a membres de la família HNF (Sharma et al. 1997); (Wu et al. 1997); (Ben-Shushan et al. 2001); (Gerrish et al. 2000).

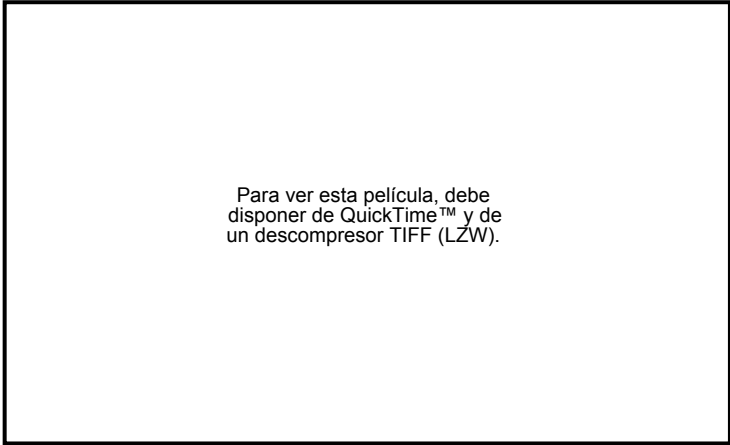
3.6. Diferenciació de les cèl.lules acinars exocrines

El pàncrees exocrí està constituït per les cèl.lules acinars, que produeixen diversos enzims digestius, i les cèl.lules dels conductes que transporten aquests enzims al duodè. Les cèl.lules acinars produeixen més de 20 enzims diferents, com amilases, lipases i nucleases, la majoria dels quals se secreten com a precursors inactius i s'activen un cop han entrat al duodè.

Les senyals del mesènquima són importants per estimular el desenvolupament del pàncrees exocrí i per determinar la taxa entre teixit exocrí-endocrí del pàncrees. Quan es cultiva pàncrees *in vitro* en absència de mesènquima, no es desenvolupen cèl.lules exocrines i, en canvi, es promou la diferenciació de l'epiteli cap a teixit endocrí (Gittes et al. 1996).

El gen *Ptf1a* codifica per una proteïna (p48) bHLH, específica de teixit, que inicialment es va identificar com essencial per al desenvolupament pancreàtic exocrí. La proteïna p48 és la subunitat B del complex de transcripció hetero-oligomèric PTF1, que s'uneix a molts dels promotors dels gens que s'expressen al pàncrees digestiu. p48 és necessari per la formació de les cèl.lules acinars i dels conductes. Els ratolins nomenats homozigots nuls per a *Ptf1a* (p48) presenten una falta total de teixit exocrí i, tot i que els illots pancreàtics se segueixen formant, es troben localitzats de manera heterotòpica en la melsa (Krapp et al. 1996). Aquest fet indica que factors produïts en el pàncrees exocrí són necessaris per regular l'organització espacial de les cèl.lules endocrines. El teixit pancreàtic exocrí proveeix un nínxol físic per al pàncrees endocrí. *Pdx1* està present a nivells basals a les cèl.lules acinars i i s'ha descrit que PDX1 i PTF1 s'uneixen i participen de forma cooperativa en l'activació del gen de l'elastasa a les cèl.lules acinars (Rose et al. 2001). *Ptf1a* no només té un paper en la diferenciació de les cèl.lules exocrines, sinó que és també fonamental en l'especificació del pàncrees (Fig. 23). En absència de *Ptf1a* les cèl.lules progenitores del pàncrees, per defecte, es diferencien en cèl.lules duodenals (Kawaguchi Y 2002).

Figura 23. L'expressió de *Ptf1a* en el domini d'expressió *Pdx1* defineix les cèl.lules que adoptaran un destí pancreàtic. Extret de (Kumar and Melton 2003).



Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (LZW).

El gen *Mist1*, que codifica per un factor de transcripció bHLH, s'expressa específicament en les cèl.lules acinars. El ratolí mutant té una degeneració progressiva del pàncrees exocrí (Pin et al. 2001). Els enzims digestius, en comptes de ser secretats en el sistema dels conductes, s'activen intracel.lularment, provocant una autolisi i lesions tissulars. Al llarg del temps, el pàncrees d'aquests ratolins es va inflamant i tornant cístic, recapitulant el que es produeix en una pancreatitis crònica humana. La pèrdua de cèl.lules exocrines és deguda tant a una desdiferenciació fenotípica com a la mort cel.lular; les cèl.lules acinars són substituïdes per cèl.lules dels conductes, i cel.lules individuals co-exprimen antigens tan de cèl.lules dels conductes com acinars.

Finalment l'expressió ectòpica de *Pdx1* al pàncrees exocrí d'un ratolí transgènic provoca la disrupció del fenotip cel.lular exocrí, indicant que la regulació a la baixa de l'expressió de *Pdx1* és essencial per al desenvolupament normal del compartiment exocrí (Heller et al. 2001).

3.7. Els models de diferenciació endocrina

Com ja s'ha esmentat, tant les cèl.lules endocrines com exocrines del pàncrees s'originen a partir d'una cèl.lula progenitora que expressa *Pdx1*. Dins la cascada de diferenciació pancreàtica, les cèl.lules que expressen *Ngn3*, representen un precursor comú per a la població de cèl.lules endocrines. S'han proposat dos models per explicar la divergència en la diferenciació de les cèl.lules endocrines, que resulten en la formació dels quatre tipus cel.lulars diferents dels illots (α , β , δ , PP).

-Un primer model descriu les cèl.lules endocrines derivant d'una cèl.lula progenitora pluripotent multi-hormonal. En aquest model, la inducció o extinció selectiva de l'expressió hormonal determinaria el destí cel.lular durant el desenvolupament, resultant en una expressió hormonal amb un patró restringit exhibit pels diferents fenotips hormonals de les cèl.lules que formen els illots (Guz et al. 1995). Al 1988 ja proposà un model on totes les cèl.lules endocrines del pàncrees és diferenciarien a partir d'una cèl.lula progenitora comuna, que probablement seria semblant a una cèl.lula α (Alpert et al. 1988).

-El segon model descriu les cèl.lules α i β diferenciant-se per dues vies independents. Les tècniques moleculars modernes han donat més suport a aquest darrer model de diferenciació. Herrera i col. van analitzar el desenvolupament de llinatge cel.lular en els illots pancreàtics, marcant irreversiblement la progènie cel.lular (Herrera 2000). La conclusió essencial d'aquest estudi va ser que les cèl.lules α adultes productores de glucagó i les cèl.lules β productores d'insulina deriven de cèl.lules que no han expressat mai insulina o glucagó, respectivament, suggerint l'existència de llinatges separats per als dos tipus cel.lulars. Les progenitores de les cèl.lules β , però no les progenitores de les cèl.lules α , expressen el gen polipeptídic pancreàtic PP. Un altre estudi que recolza aquest darrer model, es basa en l'anàlisi de l'expressió gènica de diferents factors de transcripció específics de pàncrees, durant el procés de diferenciació pancreàtica. En aquest treball s'observa un desenvolupament independent de les cèl.lules α i β a partir de les cèl.lules precursors que expressen *Ngn3* (Jensen et al. 2000).

Així doncs, l'acumulació de resultats de diferents estudis suggereix que els precursors positius per *Ngn3* queden destinats a un destí cel.lular endocrí via activació del gen *Beta2/NeuroD*. La divergència terminal cap a un tipus cel.lular específic depèn d'una seqüència temporal d'activació i inactivació gèniques de diferents factors de transcripció. L'expressió de *Brain4 (Brn4)* determina el destí a cèl.lula α , mentre que l'expressió sostinguda de *Pdx1*, *Pax4* i *Nkx6.1* determinen el fenotip de cèl.lula β .

Tot i així, la validesa d'aquest model ha estat posada en qüestió per altres investigadors. Estudis sobre la regulació de la diferenciació pancreàtica en un cultiu de cèl.lules INS1 derivades dels illots, que presenten propietats pluripotents limitades, demostren que la sobreexpressió de la forma dominant negativa de PDX1 en el cultiu causava una marcada repressió de l'expressió del gen de la insulina i una pronunciada inducció de l'expressió del gen del glucagó, sense canvis evidents en els nivells de BRN4 (Wang et al. 2001). El doble marcatge immunofluorescent evidenciava que la supressió de la funció de *Pdx1* convertia el llinatge cel.lular de les cèl.lules β productores d'insulina dels illots INS1, a un fenotip dominant de cèl.lules α . Aquesta observació suggeriria l'existència de plasticitat en la diferenciació de les cèl.lules endocrines. Tot i que aquestes observacions no entren en conflicte directe amb el model de desenvolupament endocrí, entren en discussió amb la irreversibilitat de la diferenciació terminal.

3.8. La plasticitat cel.lular

El concepte de plasticitat en els tipus cel.lulars dels illots es veu recolzat per les observacions de transdiferenciació dels llinatges cel.lulars, fetes en el camp de les cèl.lules mare (Weissman et al. 2001). També se'n dedueixen conclusions similars de les observacions fetes en el ratolí KO condicional per *Pdx1*, obtingut per recombinasa *Cre* regulada pel promotor de la insulina-1 (Ahlgren et al. 1998). En aquests estudis, l'expressió de *Pdx1* era reprimida només en les cèl.lules β completament diferenciades. En seccions pancreàtiques del ratolí KO condicional, s'observava una disminució del 40% en les cèl.lules positives per la insulina i un increment significatiu en les cèl.lules positives pel glucagó. Aquest augment en el nombre de cèl.lules positives pel glucagó, estava associat amb una distribució més homogènia d'aquestes cèl.lules dins l'illot, comparada amb la seva distribució perifèrica en els illots del ratolí salvatge. A més, aproximadament un 20% de totes les cèl.lules insulina i glucagó positives, coexpressaven les dues hormones (Ahlgren et al. 1998).

Sembla doncs, que *Pdx1* tindria un paper crític en definir i mantenir el llinatge cel.lular de les cèl.lules dels illots, ja que la seva supressió en les cèl.lules β diferenciades, permet la transdiferenciació cap a cèl.lules α productores de glucagó. Així, la veritable natura de la diferenciació de les cèl.lules dels illots a partir d'una cèl.lula mare/precursora comuna, seria un procés més plàstic del que es creia, i que no s'ha d'entendre com un procés líneal, sinó més aviat com un procés integrador.

3.9. Desenvolupament pancreàtic postnatal.

3.9.1. La replicació

És ben conegut que alguns teixits adults com el fetge, el moll de l'os i la pell, mantenen la capacitat de regenerar. En canvi, és creia que les cèl.lules β no tenien aquesta funció i que el nombre de cèl.lules existents en el naixement es mantenia al llarg de la vida. Tanmateix, sembla ser que la capacitat regenerativa del illots pancreàtics es dona a una taxa substancial (Bonner-Weir 2000). En els illots adults normals, la renovació de cèl.lules β queda equilibrada entre la constant generació de noves cèl.lules i la mateixa taxa de mort per apoptosi. Anàlisis estadístiques apunten que la massa sencera de cèl.lules β es renova cada 30-40 dies en el pàncrees del ratolí adult, amb una taxa de renovació del 2-3% per dia (Finegood et al. 1995) (Fig. 24).

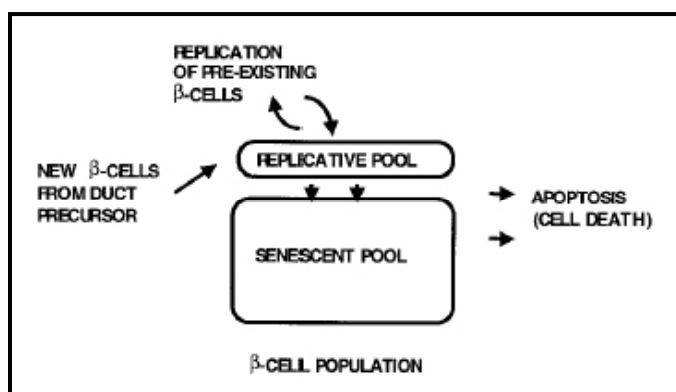


Figura 24. Esquema simplificat del model segons el qual la població de cèl.lules β es renovaria constantment a partir de la replicació de cèl.lules β pre-existents i de la diferenciació de cèl.lules precursors que es podrien trobar localitzades en els conductes del pàncrees. Extret de (Bonner-Weir 2000).

L'evidència de l'existència de renovació de cèl.lules β , va tenir lloc a partir d'observacions indirectes tals com:

1) L'habilitat per mantenir l'euglicèmia és crítica per la vida. Així doncs ja que només un petit percentatge d'individus amb obesitat, resistència a la insulina i embaràs, es tornen diabètics, sembla evident que en resposta a un augment en la demanda d'insulina, es dona un increment compensatori en la massa de cèl.lules β per tal d'augmentar la producció d'insulina i per tant una generació de noves cèl.lules β (Sorenson and Brelje 1997).

2) En autòpsies humanes en pacients amb diabetis de tipus 2, s'ha observat una reducció de 40-60% de la massa de cèl.lules β , comparant amb individus no diabètics (Westermarck and Wilander 1978); (Westermarck and Wilander 1978); (Sakuraba et al. 2002) possiblement degut a un defecte en el mecanisme que modifica la massa de cèl.lules β en resposta a la demanda d'insulina. Aquestes circumstàncies poden ser conseqüència d'una predisposició genètica, factors ambientals (ex. glucotoxicitat/lipotoxicitat), o ambdós. Un bon exemple d'aquesta plasticitat pancreàtica, es dona en el ratolí KO heterozigot pel gen del receptor de la insulina i pel gen del substrat insulina-1. Aquest ratolí incrementa x40 la seva massa de cèl.lules β és capaç de mantenir la normoglicèmia (Bruning et al. 1997). Aquest efecte compensatori en la massa de cèl.lules β per tal de fer front a l'increment a la demanda d'insulina ha estat interpretat per

alguns autors, com el resultat d'una estimulació contínua en la replicació de les cèl.lules β preexistents (Bonner-Weir 2000). Així, no és estrany que molts esforços d'investigació estan enfocats actualment en el tractament de la diabetis de tipus 2 per estimulació del creixement/proliferació de les cèl.lules β , per tal d'incrementar-ne la seva massa cel.lular. Recentment ha estat demostrat que l'hormona incretin *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) està implicada en la proliferació i diferenciació de les cèl.lules β (Perfetti et al. 2000).

3.9.2. La neogènesi

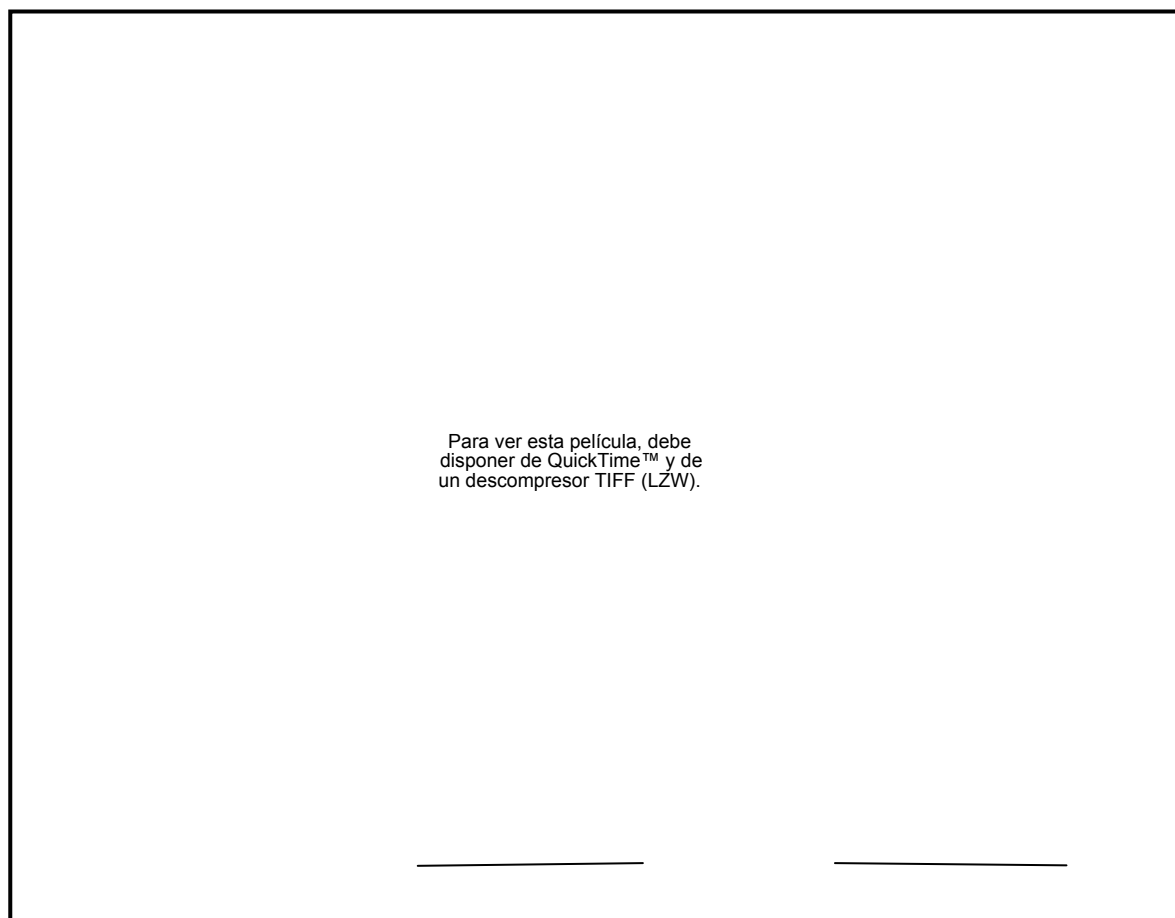


Figura 25. Segons aquest model existirien cèl.lules precursoras indiferenciades en els conductes del pàncreas, que podrien ser una font de noves cèl.lules endocrines. En els illots també es podrien trobar cèl.lules progenitores endocrines, que serien positives per nestinaa. Extret de (Melton et al. 2003).

S'estan fent grans esforços per entendre els mecanismes que dirigeixen la neogènesi en el pàncreas adult. Consistent amb la idea que la neogènesi copia el desenvolupament embrionari (ontogènia), ha estat proposat el concepte de cèl.lula mare facultativa, on algunes cèl.lules adquiririen un caràcter de cèl.lula mare després d'una estimulació determinada (Alison 2002); (Oh et al. 2002). Després d'una lesió pancreàtica, aquestes cèl.lules proliferarien i es diferenciarien en cèl.lules β que migrarien per formar nous illots i/o reomplir els preexistents. L'origen d'aquestes noves cèl.lules β és controvertit i basant-se en observacions immunohistoquímiques, se n'han proposat diferents fonts. S'ha suggerit que les cèl.lules

progenitores o cèl.lules mare pancreàtiques adultes es troben en l'epiteli dels conductes (Zajicek et al. 1990); (Bonner-Weir et al. 1993); en els illots (Finegood et al. 1995); (Zulewski et al. 2001), o en el moll de l'òs (Janus et al. 2003) (Fig. 25).

Un dels problemes més importants a què ha de fer front la recerca de cèl.lules mare en el pàncrees és la falta de marcadors moleculars adients. Lumelsky i col. (2001) proposen la nestina com a marcador d'aquestes cèl.lules mare. La nestina es coneix com un marcador de cèl.lules mare neuroepitelials, ja que és una proteïna que forma part dels filaments intermedis i que s'expressa de forma transitòria en els estadis primerencs del desenvolupament i en els processos de regeneració de diversos òrgans (Lendahl et al. 1990); (Dahlstrand et al. 1992); (Morshead et al. 1994); (Lardon et al. 2002); (Matsuoka et al. 2002); (Shibuya et al. 2002). Experiments realitzats després d'una pancreateomia parcial demostren que hi ha cèl.lules positives per nestina amb alta taxa replicativa que en cultiu primari poden diferenciar-se cap a cèl.lules endocrines (Kim et al. 2004). Tot i així, l'existència de cèl.lules positives per la nestina en les cèl.lules dels conductes és controvertida (Bonner-Weir and Sharma 2002); (Lardon et al. 2002); (Selander and Edlund 2002).

Altres grups han suggerit que les cèl.lules β en l'adult es formen per transdiferenciació de cèl.lules acinars pancreàtiques (Lipsett and Finegood 2002), cèl.lules dels illots que expressen hormones a part de la insulina (Guz et al. 2001) o esplenòcits (Kodama et al. 2003). Tots aquests models i suggerències, estan majoritàriament basats en interpretacions de dades histològiques estàtiques, més que no pas per anàlisi de llinatge directe. Tot i que, recentment en un estudi fet amb tècniques d'anàlisi de llinatge i utilitzant un sistema de *Cre/lox* induïble, es conclou que les cèl.lules β preexistents són la font principal de noves cèl.lules β durant la vida adulta i durant la regeneració després d'una pancreateomia parcial (Dor et al. 2004).

Tot i que la recerca de factors reguladors implicats en el desenvolupament pancreàtic ha avançat molt durant els últims anys, encara queden molts temes per resoldre sobre com els diferents factors interactuen per formar el programa genètic que controla el desenvolupament pancreàtic. Els resultats obtinguts en l'estudi d'aquests factors que regulen el desenvolupament, ha fet canviar la idea de quines són les relacions entre els diferents llinatges pancreàtics i ha obert noves vies dirigides a l'estudi de com aquests diferents gens es combinen per especificar la identitat cel.lular durant el desenvolupament d'aquest òrgan. Tot i que es coneixen un gran nombre de factors reguladors, encara no ha estat possible repetir el programa pancreàtic en cèl.lules no pancreàtiques, ni aconseguir cèl.lules productores d'insulina a partir d'un precursor pancreàtic.

En comptes d'entendre l'especificació final d'un determinat llinatge cel.lular com el resultat de l'acció d'uns gens clau determinats, s'està extenent la visió del desenvolupament pancreàtic com una xarxa de gens que actuen en combinació i en períodes definits. Per tant, és important ampliar la informació que és té d'aquests factors reguladors (la majoria basada en estudis de KO), estudiant-ne la funció en el seu propi context, per tal de poder identificar les seves veritables capacitats. Per això és interessant utilitzar diferents tècniques experimentals

que combinin tant les dades més estàtiques d'estudis histològics amb els anàlisis dels diferents marcadors, com anàlisis de llinatge pel sistema *Cre/lox* i també, experiments de transplantaments.

En conclusió, per entendre el desenvolupament d'un òrgan i el comportament d'una cèl.lula en un teixit determinat, és important tenir en compte, no només els factors reguladors intrínsecs del tipus cel.lular que s'estudia, sinó també els canvis en l'activació gènica i els factors que la regulen; i com aquests poden produir un canvi de fenotip. També s'ha de tenir en compte com tots aquests factors intrínsecs, són regulats per d'altres factors extrínsecs, tals com senyals morfogenètiques, així la combinació de totes aquestes dades, aporten una nova visió del funcionament d'aquest programa pancreàtic i de com se'n regula el desenvolupament.

4.GENS REGULATS PER *PDX1* EN ELS ILLOTS PANCREÀTICS

Els illots de Langerhans són les unitats funcionals del pàncrees endocrí. Les cèl.lules β productores d'insulina constitueixen un 60-80% de tota la població cel.lular, i es troben situades en el nucli dels illots. Les cèl.lules α , δ i PP, que produeixen glucagó, somatostatina (SST) i PP, respectivament, es troben localitzades a la perifèria dels illots. Aproximadament un 90% de les cèl.lules β i un 15% de les δ expressen *Pdx1*. En les cèl.lules β , *PDX1* regula els gens de la insulina, el polipèptid amiloid dels illots (IAPP), la glucocinasa (GK) i el transportador de glucosa 2 (GLUT2). A més, *PDX1* també regula l'expressió de SST en les cèl.lules δ . La capacitat de *PDX1* per activar la transcripció d'aquests gens de manera específica de teixit, depèn de la seva interacció amb altres factors de transcripció.

4.1.Regulació de la transcripció del gen de la insulina

La insulina sintetitzada per les cèl.lules β dels illots pancreàtics és de gran importància fisiològica en la homeostasi metabòlica. Mentre que la insulina madura consisteix en dues cadenes polipeptídiques unides per ponts disulfur, el gen codifica per una cadena senzilla precursora altament conservat, la preproinsulina (Chan et al. 1976). En la majoria de les espècies, la preproinsulina existeix com a un gen únic, mentre que en el ratolí i la rata, existeixen dos gens de la insulina no-al·lèlics, resultant d'un retropseudogen específic del llinatge dels rosegadors. El gen de la insulina humana es localitza en el braç curt del cromosoma 11 (p15.5) (Harper et al. 1981), els gens de la rata insulina I i insulina II, es localitzen en el cromosoma 1 (Soares et al. 1985) i els gens del ratolí es localitzen en dos cromosomes diferents, insulina I en el cromosoma 19 (Davies et al. 1994) i insulina II en el cromosoma 7 (Duvillie et al. 1998). En els illots adults els gens no-al·lèlics s'expressen i es regulen coordinadament (Giddings and Carnaghi 1988); (Koranyi et al. 1989). El gen de la insulina II de rosegador i el gen humà contenen tres exons i dos introns, mentre que al gen insulina I li falta el segon intró (revisat a

(Steiner et al. 1985)). Així doncs, la insulina es regula a diferents nivells, des de la transcripció del gen fins a la secreció de la insulina per les cèl.lules pancreàtiques.

4.1.1. Expressió específica a cèl.lula β

En l'embrió de ratolí es comença a detectar mRNA d'insulina en l'estadi E9 (20 somites) (Gittes and Rutter 1992), en l'àrea de l'intestí anterior, on es desenvoluparà el pàncrees. En humans apareixen cèl.lules positives per insulina a la vuitena setmana del desenvolupament embrionari (Polak et al. 2000). Durant la vida postnatal, l'expressió del gen de la insulina queda restringida a les cèl.lules β . Aquesta especificitat de teixit és controlada per regions reguladores de la regió 5' flanquejant del gen (German et al. 1995): uns quants centenars de parells de bases a 5' del lloc d'inici de la transcripció són suficients per conferir especificitat d'expressió en cèl.lula β a un gen exogen *reporter* en cèl.lules transfectades i ratolins transgènics.

Anàlisis de mutacions i delecions en diverses regions promotores del gen de la insulina, dutes a terme en línies cel.lulars transfectades i ratolins transgènics, han permès la identificació de seqüències reguladores que actuen en *cis*, necessàries per l'expressió específica. La regulació de la transcripció del gen recau en la interacció de seqüències motiu del promotor amb un nombre de factors de transcripció, tan ubiqües com específics d'illots. Aquestes interaccions determinen la regulació de l'expressió del gen de forma positiva o negativa i la seva inducció enfront diferents estímuls fisiològics. La unió de les proteïnes a aquests elements reguladors ha permès la identificació i el clonatge de putatius factors de transcripció reguladors del gen de la insulina.

4.1.2. Elements del promotor de regulació positiva

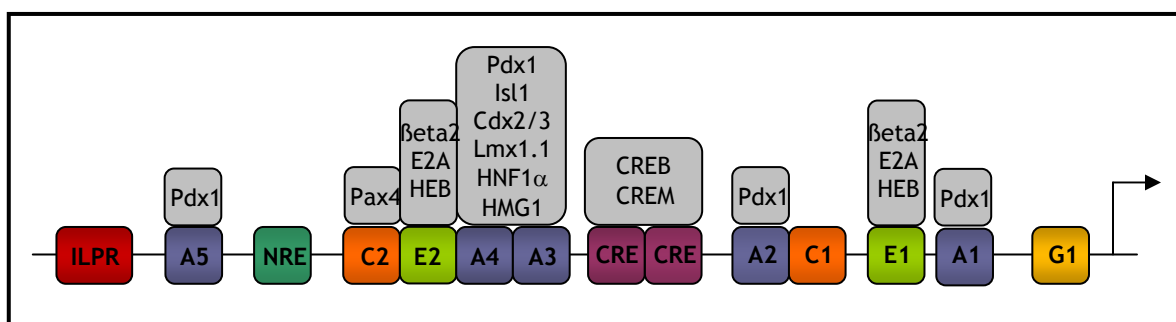


Figura 26. Caixes reguladores i factors de transcripció que s'hi uneixen, en el promotor del gen de la insulina humana. Modificat de (Ashizawa et al. 2004).

Els gens de la insulina comparteixen motius de DNA conservats en les seves regions 5' flanquejants, implicant que poden estar regulats per factors en *trans* similars (German et al. 1995). Entre aquests, els elements E, A i C1/RIPE3b semblen ser els majors determinants de l'expressió específica en cèl.lules β del gen. Un esquema d'aquests elements i els factors de transcripció que s'hi uneixen es mostren en la Figura 26.

Caixes E (E1 i E2) Estudis de mutagènesi i transfecció realitzats amb el promotor del gen la insulina I de rata han permès la identificació de dues repeticions relacionades, importants en l'expressió específica en cèl.lules β (Karlsson et al. 1987). Aquests elements localitzats entre -104 i -112 (IEB1/E1) i -233 i -241 (IEB2/E2), contenen una seqüència nucli que pertany als motius reguladors anomenats caixes E, la seqüència consens CANNTG. Les mutagènesis en la regió 5' flanquejant del promotor de la insulina II de rata, mostren també un motiu E1 (-100 fins -91) essencial per a l'expressió selectiva del gen (Crowe and Tsai 1989); (Whelan et al. 1989).

A les caixes E s'uneixen proteïnes de la família bàsic *helix-loop-helix* (*bHLH*), que funcionen com a potents activadors transcripcionals de gens específics de teixits, formant heterodímers entre membres ubícu (classe A) i membres específics de cèl.lula (classe B). A E1 s'uneix el complex heterodimèric IEF1, que pot incloure una de les dues proteïnes generades per *splicing* alternatiu del gen E2A, les proteïnes bHLH àmpliament distribuïdes E12/E47 i les proteïnes HEB (revisat a (Massari and Murre 2000)). Aquestes al seu torn, interactuen amb les proteïnes bHLH específiques de tipus cel.lular BETA2/NeuroD, que s'expressen en cèl.lules neuroendocrines i pancreàtiques, i que són reguladors importants de l'expressió del gen de la insulina (Naya et al. 1995) i del desenvolupament pancreàtic tal com s'ha esmentat anteriorment (Naya et al. 1997). Mutacions que afecten les propietats transactivadores del factor BETA2/NeuroD o la seva unió a DNA, predisposen a la diabetis (Malecki et al. 1999). Tanmateix, mutacions en el gen E2A, no tenen cap efecte sobre el fenotip de les cèl.lules β (Itkin-Ansari et al. 1996), degut a la redundància que existeix entre els membres de la classe A de la família bHLH. El complex E47/BETA2 també controla la transcripció del gen del glucagó, unint-se al seu promotor amb una afinitat més baixa que al promotor de la insulina (Dumonteil et al. 1998).

Caixes A Són elements reguladors que contenen seqüències riques en AT (A1-A5)(German et al. 1995). Exepte A2 (GGAAAT), els altres elements contenen la seqüència core TAAT, que uneix factors proteics amb homeodomini. Tot i que A1 i A3 són les caixes més conservades, les mutacions a A3 tenen un efecte més dramàtic sobre la transcripció (Petersen et al. 1994); (Marshak et al. 1996); (German and Wang 1994). Aquests elements del promotor uneixen el factor de transcripció amb homeodomini PDX1. Tot i que normalment PDX1 estimula l'expressió específica en illots, unint-se a aquests elements com a monòmer, s'ha observat que també pot formar complexos heterodimèrics amb PBX, l'homòleg en mamífers de l'*extradenticle* de *Drosophila*, i unir-se al promotor de la somatostatina (Peers et al. 1995). Aquest complex també s'ha observat en cèl.lules exocrines, regulant l'expressió del gen de l'elastasa (Swift et al. 1998).

En el gen de la insulina I de rata, les caixes juxtaposades A3 i A4, uneixen factors addicionals que, tot i que no són específics de cèl.lula β , la seva expressió es limita a pocs tipus cel.lulars. Alguns d'aquests factors són *Isl-1* (Karlsson et al. 1990), *Cdx2/3*, *Lmx-1* (German et al. 1992); HNF1 α (Emens et al. 1992); HMGI (Y) (Ohneda et al. 2000).

RIPE3b L'element RIPE3 (-126 -86) de la insulina II de rata confereix l'activitat específica de cèl.lula β en experiments de transfecció. El control positiu de RIPE3 és mediat pels elements

RIPE3b i E1/ICE. RIPE3b està format per dues seqüències solapades, A2 (-126 -113) i l'element ric en C, C1 (-118 -107). A2 uneix un complex específic anomenat A2.2, que només es detecta en línies cel·lulars productores d'insulina (Harrington and Sharma 2001). C1 uneix dos complexos: RIPE3b1-Activador/C1, específic de cèl.lula β , i RIPE3b2, distribuït de forma més general (Shieh et al. 1991). La capacitat de la proteïna d'unió RIPE3b1 d'immunoprecipitar específicament amb un anticòs anti-fosfotirosina, suggereix que les senyalitzacions per fosfatases tirosines cinases i/o fosfatases, poden estar involucrades en l'expressió regulada del gen de la insulina, actuant sobre RIPE3b1 (Matsuoka et al. 2001).

Element de resposta a AMP cíclic (CRE) El segon missatger cíclic AMP regula la transcripció dels gens amb elements de resposta a AMP (CREs), la majoria unint el factor de transcripció CREB (*CRE binding protein*). Aquest mecanisme involucra activació per proteïna cinasa A. Així doncs, CREB fosforilat interactua amb la maquinària basal de transcripció unint el coactivador proteïna d'unió a CREB (CBP) i activa la transcripció. En les cèl.lules β , la glucosa i certes hormones com el glucagó i l'*incretin GLP1* incrementen els nivells intracel·lulars de cAMP (Drucker et al. 1987); (Skoglund et al. 2000). En el gen humà s'han identificat quatre llocs d'unió (dos en la regió promotora), que contribueixen additivament a la inducció per cAMP (Inagaki et al. 1992). El CRE del gen de la insulina I de rata confereix activitat basal, amb una resposta relativament baixa a cAMP.

El gen modulador de CRE (CREM) genera una sèrie d'isoformes per *splicing* alternatiu que actuen com a activadors i/o repressors transcripcionals (Foulkes et al. 1991). Els activadors CREM ha estat demostrat que estimulen la transcripció del gen de la insulina de manera més eficient que CREB, aparentment, per unió directa als components de la maquinària basal de transcripció. Els repressors CREM, no interactuen amb aquests, sino que suprimeixen la transcripció competint amb els activadors CREM o CREB pels seus llocs d'unió (Inada et al. 1999).

Element C2 L'element C2 va ser inicialment descrit en el gen de la insulina humà (-253 -244) i conté la seqüència repetitiva CAGG (Read et al. 1997). Tot i que no s'han trobat motius equivalents en els promotors de rata, en el promotor de la insulina I de rata existeix una seqüència relacionada CACC entre el -329 i -307. Aquest element C2 uneix els factors de transcripció que contenen el domini *paired* i l'homeodomini, com PAX6 que actua com a transactivador (Sander et al. 1997) i PAX4, com a repressor transcripcional (Fujitani et al. 1999); (Smith et al. 1999); (Campbell et al. 1999). Aquest fet no és degut a competència pel mateix lloc d'unió, ja que la repressió es manté, fins i tot quan el domini d'unió a DNA de PAX es reemplaçat per la proteïna heteròloga GAL4 (Smith et al. 1999).

G1 o caixa-GAGA Un altre element regulador important en el promotor del gen de la insulina I de rata és la caixa G/GAGA. És una seqüència rica en purines que es localitza entre -57 -40 bp. La proteïna amb dits de zenc ubíqua Pur-1/MAZ s'uneix al promotor del gen de la insulina I i II de rata i n'estimula la seva activitat (Kennedy and Rutter 1992). Tot i així, la contribució de G1 en el promotor humà és controvertida, ja que no uneix el factor de transcripció *Pur1* i mutacions a la seqüència, no tenen efecte en la seva transcripció (Odagiri et al. 1996).

Regió polimòrfica lligada a la insulina o ILPR (VNTR, HVR) *Insulin-linked polymorphic region* (ILPR), també anomenada *variable number of tandem repeats* (VNTR) o regió hipervariable (HVR), es troba aproximadament a -360 bp en el promotor del gen humà. Té un nombre variable de repeticions de la seqüència ACAGGGT(G/C)(T/C)GGGG. Aquestes repeticions polimòrfiques han estat classificades en 3 grups diferents: Classe I- al·lels que presenten aproximadament 40 repeticions, la classe més comuna, Classe II- amb aproximadament 85 repeticions, la classe menys freqüent, i classe III, amb aproximadament 157 repeticions. El fet que el locus IDDM2, que confereix susceptibilitat a la diabetis de tipus 1 (insulina dependent), hagi estat mapat en la regió ILPR ha generat molt d'interès per la seva possible implicació en la transcripció del gen de la insulina. Aquest minisatèlit polimòrfic ric en G, té la característica de formar hèlix quadrúplex de DNA *in vitro*, possiblement per la formació de quartets amb G (mitjançant enllaços Hoogsteen) (Hammond-Kosack et al. 1992). ILPR conté llocs d'unió amb elevada afinitat per *Pur1* (Kennedy and Rutter 1992).

És evident que la regulació del gen de la insulina es dona a través de múltiples activadors, fent que es doni un mecanisme de control combinatorial. De fet, la combinatòria de múltiples activadors en un únic complex, dona la capacitat de poder integrar múltiples *inputs* reguladors en una única resposta.

Les interaccions cooperatives més estudiades són les que es donen entre els elements juxtaposats A i E. El promotor de la Insulina I de rata, i més exactament el *minienhancer* compost del motiu E2 i els elements A3/A4 -anteriorment anomenat regió Far-Flat (FF), ha estat la regió més estudiada en aquest tipus d'anàlisi. En cèl·lules β transfectades, els factors amb homeodomini que s'uneixen als elements A3/A4 interactuen funcionalment amb les proteïnes codificades per E2A. PDX1 actua sinèrgicament amb E47 per activar la transcripció (Leonard et al. 1993); (Serup et al. 1995); (Peshavaria et al. 1997). Aquesta activació sinèrgica requereix tant el domini d'unió com el d'activació de PDX1, i les proteïnes bHLH. El paper de PDX1 també inclou el reclutament dels factors de transcripció E47, BETA2/NeuroD i la proteïna de grups d'alta mobilitat I, HMGI(Y), per formar un complex activador en el *minienhancer* FF (Ohneda et al. 2000). El mateix HMGI(Y) s'uneix directament als elements A3/A4, per augmentar la sinèrgia transcripcional de PDX1 i bHLH (Ohneda et al. 2000). Una altra proteïna amb homeodomini *lmx1.1*, s'uneix a A3/A4 i actua sinèrgicament via el seu domini LIM amb E47 per activar la transcripció (German et al. 1992). L'enhancer RIPE3 del promotor de la insulina II conté una caixa E1 que coopera amb l'element RIPE3b1 (Hwung et al. 1990); (Shieh and Tsai 1991). Els heterodímers E47:BETA2/NeuroD requereixen la presència del complex específic de cèl·lula β RIPE3b1-Act/C1 per activar la transcripció del gen de la insulina (Sharma and Stein 1994); (Naya et al. 1995). En el gen humà, també s'ha observat sinèrgia entre E1 i A1 o E1 i A2C1 (Odagiri et al. 1996).

Els mecanismes necessaris per a una activació eficient del promotor del gen de la insulina encara no són del tot clars. Sembla que E2A, BETA2/NeuroD i PDX1 tenen una unió cooperativa, no només interactuant directament, sino també a través d'interaccions indirectes proteïna-

proteïna, amb la participació de coactivadors. Tot i que encara no ha estat caracteritzat cap coactivador específic de cèl.lula β , recentment ha estat identificada una nova proteïna que interactua amb E2A. Aquesta proteïna, Bridge-1, s'expressa a nivells elevats en illots on funciona com un coactivador, promovent la transcripció del promotor del gen de la insulina I de rata, mediada per E12, E47. L'inactivació del Bridge-1 endogen en cèl.lules INS-1, utilitzant RNA antisentit, disminueix l'activitat del promotor (Thomas et al. 1999).

Finalment, el coactivador ubicu p300 i el seu homòleg CBP són acetiltransferases d'histones, que estimulen la transcripció de gens específics, interaccionen directament o a través de cofactors, amb factors de transcripció i amb la maquinària basal de transcripció (Imhof et al. 1997). També ha estat descrita la cooperació entre p300 i proteïnes bHLH per activar la transcripció mediada per la caixa E (Eckner et al. 1996).

Així doncs, l'expressió específica de teixit del gen de la insulina, sembla dependre no només de combinacions específiques de factors, sino també, i potser de manera més important, de la concentració de factors de transcripció, dels quals només uns quants són restringits a cèl.lules β . Una visió completa dels mecanismes moleculars que governen aquesta expressió, necessitaria una anàlisi detallada de les interaccions que es donen entre els diferents factors de transcripció i els coactivadors.

4.1.3. Elements del promotor de regulació negativa

Existeix un element silenciador que disminueix l'activitat d'un promotor heteròleg, entre -4.0 i -2 kb de les seqüències repetitives del gen de la insulina I de rata (Laimins et al. 1986); mentre que en el gen de la insulina II de rata, entre les posicions -217 i -197 va ser identificat com a lloc de control negatiu (Cordle et al. 1991). En el gen humà, un element regulador negatiu (NRE) va ser mapat entre -280 i -260 (Boam et al. 1990); (Clark et al. 1995). NRE té seqüències solapades que uneixen diverses proteïnes nuclears, entre elles el receptor de glucocorticoids (Goodman et al. 1996), i el factor ubicu Oct1 (Clark et al. 1995). Tot i així, cèl.lules β primàries transfectades amb el promotor del gen de la insulina humà sense aquest element, presenten una activitat reduïda, indicant la presència d'un element positiu -més que un element negatiu- en aquesta regió (Odagiri et al. 1996). Sembla per tant, que la cooperació entre factors de transcripció és essencial per a l'expressió elevada del gen de la insulina, així doncs, proteïnes que interfereixin amb aquestes interaccions positives poden proporcionar el mecanisme per regular a la baixa l'expressió de la insulina.

Inhibició de l'expressió mediada per E47 L'efecte inhibitor de la transcripció de les proteïnes de la família bHLH Id -que no tenen el domini d'unió a DNA- és el resultat de la formació d'un complex heterodimèric amb poca capacitat d'unió al DNA. Les cèl.lules β exposades a altes concentracions de glucosa, augmenten l'expressió dels gens *Id1* i *Id3* (Wice et al. 2001). Això suggereix que les concentracions fisiològiques normals de Id no tenen afectes inhibitoris sobre l'expressió del gen de la insulina però que, quan se sobreexpressen, poden inhibir l'activitat del promotor (Cordle et al. 1991).

Un bon candidat com a regulador negatiu de l'expressió del gen de la insulina mediada per la caixa E és BETA3. Tot i que és una proteïna de la família bHLH, amb una alta homologia a BETA2/NeuroD, no es pot unir a la caixa E. BETA3 inhibeix la unió a DNA de l'homodímer E47 i de l'heterodímer E47/NEUROD, i per tant, reprimeix la transactivació del promotor de la insulina mediada per E47/BETA2/NeuroD (Peyton et al. 1996).

La inhibició de la transcripció de la insulina que provoca c-Jun, també actua a través de l'element E1; la repressió de l'activació transcripcional implica la regió bàsica de la cremallera de leucines de c-Jun i el domini conservat d'activació AD2 de les proteïnes E2A, E12 i E47 (Robinson et al. 1995).

Finalment, un membre de la família de factors de transcripció cremallera de leucines reprimeix específicament la transcripció del gen de la insulina en les cèl.lules β . En aquest cas, la repressió involucra la interacció directa de c/EBP β amb AD2 de E47, inhibint així la transactivació del promotor de la insulina mediada per E47 (Lu et al. 1997). De manera semblant a Id, l'expressió de c/EBP β augmenta en cèl.lules exposades de manera crònica a altes concentracions de glucosa.

4.1.4. Especificitat del complex de transcripció

Si la transcripció del gen de la insulina es dona a partir de la formació d'un complex de transcripció sobre el promotor, a partir de la interacció de tota una sèrie de factors nuclears, la transcripció del gen de la insulina específica de cèl.lula β ha de dependre de l'especificitat d'aquest complex. Aquest model sobre l'especificitat de la transcripció de la insulina en cèl.lules β porta a dues prediccions: primera, les interaccions proteïques que formen el complex han de ser molt específiques, o sigui que altres proteïnes presents en els nuclis d'altres cèl.lules no poden substituir aquestes interaccions. Segon, en absència d'algun d'aquests factors proteïcs, el complex no es forma i la transcripció del gen de la insulina és silenciada.

Però de fet, cap d'aquestes prediccions és completament correcta. PDX1 no és l'única proteïna que es pot unir als elements A i cooperar amb les proteïnes bHLH per activar la transcripció del gen de la insulina. Les proteïnes amb homeodomini tipus LIM, Lmx1.1 i Lmx 1.2, poden unir-se als elements A i actuar sinèrgicament amb els dímers bHLH donant nivells tan alts de transcripció com els produïts per la combinació PDX1-bHLH. Altres evidències que demostren que PDX1 no és essencial per a l'activació de la transcripció del gen de la insulina provenen d'estudis genètics fets en ratolí. Si PDX1 és inactivat després de la formació del pàncrees i de la diferenciació de les cèl.lules β la massa de cèl.lules β disminueix i la seva funció es veu alterada, però la massa de cèl.lules β restants, continuen produint insulina (Ahlgren et al. 1998). A més, els nivells de proteïna PDX1, en línies cel.lulars β encara que els seus nivells siguin molt disminuïts amb la utilització d'oligonucleòtids antisentit, no causen cap reducció en la transcripció del gen de la insulina (Kajimoto et al. 1997).

Per a la transcripció del gen de la insulina, tampoc semblen necessaris ni els gens E2A, ni HEB, ni BETA2/NeuroD. Els ratolins homozigots per mutacions nul·les en E2A o HEB transcriuen la

insulina a taxes normals. Estudis en ratolins mutants per BETA2/NeuroD, demostren que les proteïnes bHLH són importants per al manteniment de les cèl.lules β , però no són requerides per la transcripció de la insulina (Naya et al. 1997).

Però si cap d'aquests factors és completament necessari per a la transcripció de la insulina, com és que aquesta transcripció és específica de cèl.lules β , tot i que moltes altres cèl.lules probablement tenen alguna combinació d'aquests factors redundant? Algunes possibilitats són: primer, les cèl.lules no β poden tenir proteïnes en el seu nucli que interfereixin en la formació del complex de transcripció de la insulina (Peers et al. 1995). Segon, els nivells relatius funcionals de les proteïnes que formen els complexos poden ser importants.

4.1.5. Efectes hormonal i de la nutrició sobre l'expressió del gen de la insulina

Glucosa

En els mamífers, l'homeostasi de la glucosa necessita una fina regulació en la producció i l'alliberament d'insulina. El treball pioner realitzat per Permutt i Kipnis (Permutt and Kipnis 1972) posà de manifest que la glucosa incrementa la síntesi d'insulina, estudiant l'expressió gènica.

Les cèl.lules β responen als increments de glucosa en sang, incrementant la taxa en el metabolisme de la glucosa i estudiant la biosíntesi i l'alliberament d'insulina. La secreció d'insulina induïda per la glucosa en les cèl.lules β comença amb el tancament dels canals de potassi regulats per ATP, causant una despolarització de la membrana plasmàtica amb la subsegüent obertura dels canals de calci depenents de voltatge. L'augment en calci citosòlic desencadena el procés d'exocitosi. El metabolisme de la glucosa és essencial per induir l'expressió gènica específica de cèl.lula β (Goodison and Ashcroft 1993). A més, aquest metabolisme també és necessari per l'efecte estimulador sobre l'activitat del promotor del gen de la insulina (Goodison et al. 1992) (Fig. 27).

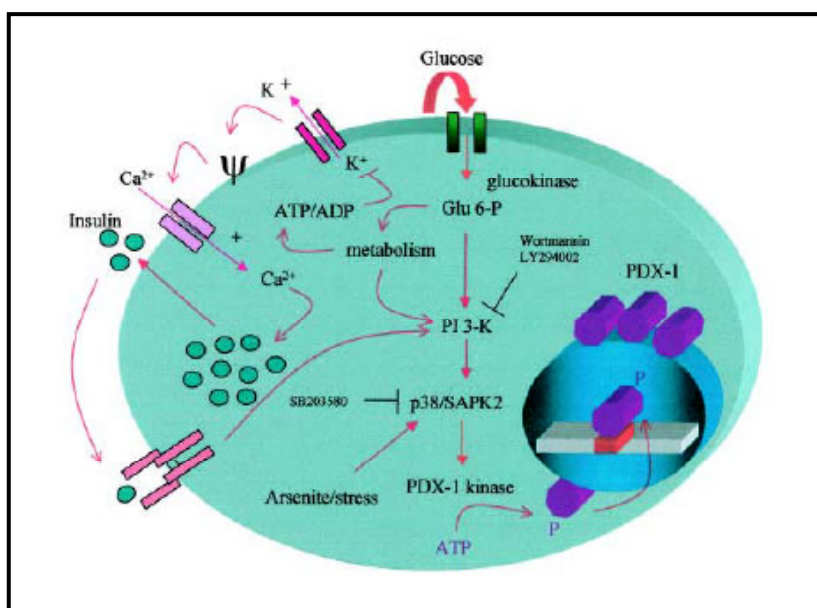


Figura 27. L'increment de glucosa en sang, provoca la tancada dels canals de potassi, i un increment del calci citosòlic, provocat per la despolarització de la membrana, que desencadena el procés d'exocitosi. Extret de (Docherty 2001).

A cèl.lules β sembla que una combinació de diferents elements en el promotor del gen de la insulina és capaç de produir la resposta a la glucosa. Els elements més estudiats en aquest context són A3, C1 i E1. Els factors que s'uneixen a aquests llocs són modulats per la glucosa, i mutacions en aquests elements en perjudiquen la regulació de la seva transcripció (Odagiri et al. 1996); (Petersen et al. 1994); (Marshak et al. 1996); (German and Wang 1994); (Sharma et al. 1995). Molts estudis han demostrat que la concentració de glucosa extracel.lular regula la unió de PDX1 i RIPE3b1-Act/C1 als elements A3 i C1, respectivament.

La proteïna més estudiada en aquest context ha estat PDX1. Una mutació puntual en l'element A3 del promotor del gen de la insulina humana suprimeix l'efecte estimulador de la glucosa en els illots adults, posant de manifest que PDX1 té un paper fisiològic important en l'expressió regulada per glucosa (Petersen et al. 1994); (Marshak et al. 1996). A més l'expressió de PDX1 en la línia cel.lular NES2Y, que no té aquesta proteïna (Macfarlane et al. 2000), igualment que als illots del model de diabetis de tipus 1 de *Psammomys obesus* als que també els falta la forma conservada de PDX1, restaura la seva capacitat per regular els nivells de mRNA del gen de la insulina en resposta a glucosa (Leibowitz et al. 2001). El potencial transactivador de PDX1, també està regulat per glucosa (Shushan et al. 1999); (Petersen et al. 1998). O sigui que, a més dels seus importants papers en el desenvolupament i diferenciació dels illots pancreàtics i expressió dels gens específics de cèl.lula β , aquesta proteïna funciona com un mediador essencial per l'efecte de la glucosa en la transcripció del gen de la insulina en les cèl.lules β diferenciades (Petersen et al. 1994); (Marshak et al. 1996); (Melloul et al. 1993); (Macfarlane et al. 1994).

El fet que la transcripció del gen de la insulina sigui inhibida per bloquejadors dels canals de calci, i activada després de la despolarització de la membrana, suggereix que l'estimulació de la transcripció sigui mediat, en part, per un increment en la concentració de calci intracel.lular, de manera anàloga a la que es dona en la regulació de la secreció d'insulina induïda per glucosa. Les observacions en contra es basen en estudis realitzats en línies cel.lulars β – com NES-PDX1- i en illots pancreàtics, que no tenen activitat de canals de calci. En resum, sembla que la manera exacta de senyalització intracel.lular que es dona en el metabolisme de la glucosa no ha estat resolta, i que les vies de secreció i transcripció de la insulina, serien diferents en alguns aspectes, així que els dos processos es podrien donar de forma independent.

Diverses vies de senyalització són activades pel metabolisme de la glucosa en les cèl.lules β , algunes de les quals semblen que també regulen la transcripció del gen de la insulina. Una és la via dependent d'AMP cíclic, que ha estat demostrat que augmenta els nivells de mRNA del gen de la insulina (Nielsen et al. 1985); (German et al. 1990). Però, en canvi, la forskolina que augmenta la concentració de cAMP intracel.lular, no té cap efecte sobre la unió de PDX1 (Macfarlane et al. 1994). Un altre mecanisme proposat pel control de l'expressió gènica en resposta als estímuls extracel.lulars, és l'activació de proteïnes cinases i/o fosfatases específiques, que únicament modifiquen l'estat de fosforilació de factors de transcripció específics. Així doncs, és molt important mapar els llocs específics de fosforilació, no només en

PDX1, sinó també en altres factors de transcripció modificats per canvis en la concentració de glucosa extracel.lular, i consegüentment, estudiar les cinases potencialment involucrades en la regulació per glucosa de l'expressió del gen de la insulina.

Efectes de l'exposició crònica a altes concentracions de glucosa

Ha estat descrit que un augment crònic de glucosa en sang, provoca una reducció en la secreció d'insulina, portant a l'estat que es coneix com "toxicitat a la glucosa". El cultiu de cèl.lules β a elevades concentracions de glucosa provoca una alteració en la capacitat d'unió d'alguns elements reguladors al promotor del gen de la insulina, disminuint la seva activitat i, per tant, disminuint els nivells de mRNA. Aquesta pèrdua d'activitat del promotor es troba associada a una reducció de la capacitat d'unió de PDX1 a l'element A3 que, al seu torn, es troba associada a una disminució en els nivells de mRNA de *Pdx1* (Marshak et al. 1999). Tot i així, aquest és un tema controvertit ja que aquest efecte tòxic de la glucosa no s'observa en totes les línies cel.lulars investigades (Welsh and Hellerstrom 1990); (Eizirik et al. 1991).

Tot i que els mecanismes moleculars que generen toxicitat per glucosa no es coneixen, la glicosilació i la generació d'espècies d'oxigen reactiu, han estat proposats com a possibles mediadors (Matsuoka et al. 1997). Per tant és important aclarir quins són els elements reguladors i factors de transcripció implicats en el control de l'expressió del gen *Pdx1* en les cèl.lules β ; se sap que part d'aquesta regulació es dona, per la unió de PDX1 en el seu mateix promotor (Marshak et al. 2000).

En conclusió, les dades que es tenen en l'actualitat suggereixen que la hiperglicèmia no controlada, pot provocar una reducció en l'expressió del gen de la insulina, una pèrdua de les reserves d'insulina de les cèl.lules β , un agreujament de la deficiència de la insulina i una disfunció metabòlica.

Insulina

Tot i que havia estat descrit un fenomen de retroalimentació negativa sobre la producció d'insulina (Argoud et al. 1987); (Ammon et al. 1991), estudis posteriors indiquen que la insulina exerciria un efecte estimulador sobre la seva producció (reviewed (Rutter 1999)). Aquestes discrepàncies poden ser degudes a la utilització de promotors del gen de la insulina i cèl.lules β de diferents orígens. Finalment, les dades que es tenen semblen indicar que tant la glucosa com la insulina (involucrant PI3-K) activen la transcripció del gen de la insulina i que aquests efectes poden ser additius a les cèl.lules β (Leibiger et al. 2000). Defectes en la senyalització de la insulina en les cèl.lules β poden contribuir a la patologia de la diabetis de tipus 2, formant així un lligam entre la resistència perifèrica a la insulina i una funció deficient de les cèl.lules β .

Àcids grassos no esterificats (NEFA)

Els àcids grassos són una important font d'energia per les cèl.lules β , on estimulen la secreció d'insulina induïda per glucosa a curt termini, però després d'una exposició prolongada, poden provocar efectes inhibidors (revisat a (Grill and Qvigstad 2000)). Tot i que ha estat

publicat que diferències en els nivells d'àcids grassos afecten la transcripció del gen de la insulina, elevades concentracions de l'àcid gras palmitat, reprimeixen l'expressió del gen de la insulina en presència d'elevada glucosa, (Ritz-Laser et al. 1999); (Gremlich et al. 1997); (Jacqueminet et al. 2000); (Briaud et al. 2001).

Glucagon-like peptide-1 (GLP1)

GLP1, l'hormona incretina fisiològica, es deriva del processament post-transcripcional del proglucagó i se secreta de les cèl.lules-L enteroendocrines de l'intestí. GLP1 s'uneix al receptor acoplat a proteïna G de les cèl.lules β per estimular la secreció d'insulina induïda per glucosa, la biosíntesi i el creixement cel.lular. Aquests efectes estimuladors sobre les funcions de les cèl.lules β , han estat parcialment atribuïts a l'increment intracel.lular de la concentració de cAMP amb la concomitant activació de PKA (revisat a (Holz GG 2001)). GLP1 també estimula el potencial del domini de transactivació de PDX1, tant en presència de baixa com d'alta glucosa (Hussain and Habener 2000).

Leptina

El gen *ob*, el seu producte la leptina i el seu receptor cel.lular (OB-R) són factors importants en la regulació de la ingesta i el balanç energètic. Encara que no és molt comú en ratolins i humans, una deficiència en la leptina causa obesitat severa, suggerint que aquesta hormona té un paper similar en les dues espècies. Tot i així, l'increment en les concentracions de leptina observades en altres humans i rosegadors apunten més cap a una resistència a la leptina, més que una deficiència d'hormona, com a contribució a l'obesitat. L'obesitat està associada amb diferents condicions patològiques, una de les quals és la diabetis de tipus 2, que resulta de la incapacitat de les cèl.lules β per respondre a l'increment en la demanda d'insulina, en compensació a la resistència a la insulina en els teixits perifèrics dels pacients (Kieffer and Habener 2000).

Hormona del creixement (GH) i prolactina (PRL)

La hormona de creixement (GH), la prolactina (PRL) i el lactogen placentari (PL) són reguladors primaris de la proliferació de les cèl.lules β . A més, aquestes hormones estimulen la producció d'insulina, estimulants, en part, la seva transcripció (Galsgaard et al. 1996); (revisat (Nielsen et al. 2001)).

4.2.Regulació de la transcripció del gen de la somatostatina

La somatostatina (SST) és un pèptid multifuncional que es produeix en el sistema nerviós central, en el tracte gastrointestinal, i en les cèl.lules δ del pàncrees. Existeixen dues formes endògenes bioactives de SST: SST-14 i SST-28, que actuen en cèl.lules endocrines, exocrines, neurals i en les cèl.lules diana dels sistema immunològic per tal d'inhibir la secreció, modular la neurotransmissió i regular la divisió cel.lular (Patel 1999).

El factor de transcripció PDX1 de fet, va ser aïllat i caracteritzat inicialment per la seva capacitat d'unió i regulació del promotor de la *SST* (Miller et al. 1994); (Leonard et al. 1993). PDX1 es detecta en un 15% de les cèl.lules δ , i la regió promotora de *SST* conté quatre llocs d'unió per PDX1, amb un motiu TAAT1 comú (Fig. 28). L'activitat del promotor de *SST* depèn d'un element anomenat *SST upstream enhancer* (SMS-UE) i 2 elements rics en A/T anomenats TAAT1 i TAAT2. SMS-UE que va dels nucleòtids -115 al -75, és un element tripartit constituït pels subdominis SMS-UE-A, -B i -C. En aquests subdominis s'hi uneixen diferents complexos proteics que tot i actuar de forma sinèrgica, serien també parcialment redundants. PDX1 s'hi pot unir formant heterodímers amb PBX1 i PREP1 a l'element SMS-UE-A (Peers et al. 1995); (Goudet et al. 1999) i amb PAX6 per reconèixer l'element SMS-UE-B (Andersen et al. 1999). Les mutacions en l'element SMS-UE-A que afecten les unions dels seus elements reguladors, no afecten l'activitat del promotor. En canvi, la mutació que inhibeix la unió de PAX6, també inhibeix l'activitat del promotor. La mutació que inhibeix específicament la unió de PDX1 en l'element proximal B redueix l'activitat del promotor de forma significativa. L'activitat de tots aquests elements del promotor de *SST* depen de la integritat de l'element de resposta a cAMP (CRE). A més de PDX1, PBX1 i PAX6, ISL1 també s'uneix a SMS-UE. Isl1 sembla que funciona sinèrgicament amb CREB per estimular nivells elevats d'expressió de *SST* (Leonard et al. 1992). Els elements TAAT1 i TAAT2 es localitzen més a 5' de SMS-UE i també uneixen PDX1 i PBX1, resultant en la transactivació del promotor de *SST* (Lu M 1996) (Fig. 28).

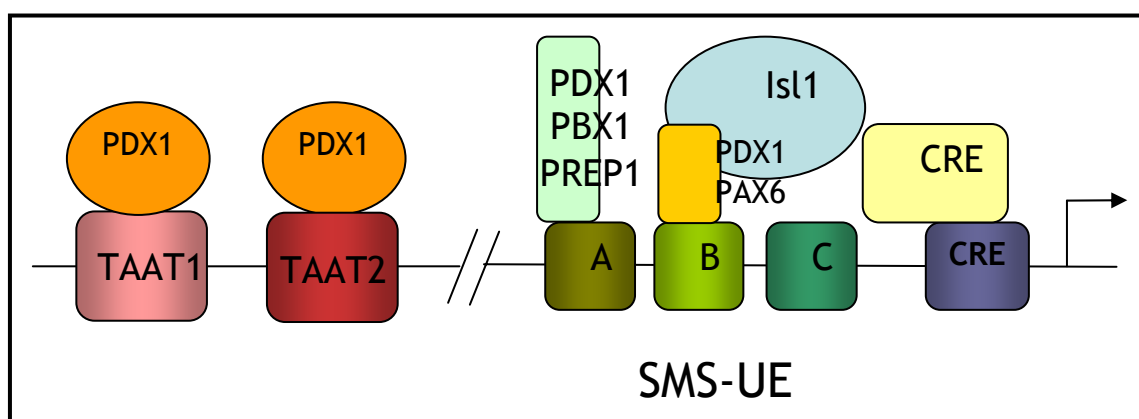


Figura 28. Estructura del promotor de la somatostatina i potencials llocs d'unió als factors de transcripció. Adaptat de (Ashizawa et al. 2004).

4.3. Regulació del polipèptid amiloid d'illots

IAPP és un pèptid de 37 amino àcids de la família de les calcitonines. En les cèl.lules β del pàncrees s'emmagatzema juntament amb la insulina en els grànuls de secreció. També s'expressa en algunes cèl.lules δ dels illots. En els pacients amb diabetis de tipus 2 s'observen dipòsits de IAPP en més del 90% de les cèl.lules β . A conseqüència de la seva capacitat per inhibir la secreció d'insulina en illots aïllats i contraposar-se a l'acció de la insulina en teixits perifèrics, ha estat proposat que IAPP tingui un paper important en la regulació dels nivells de glucosa en plasma en els mamífers (Hoppener et al. 2000); (Jaikaran and Clark 2001). El

promotor de IAPP conté tres caixes A (AT1-3) que poden unir PDX1 (Watada et al. 1996) i mutacions en les caixes AT1 o AT3 (però no AT2) disminueixen l'activitat del promotor. Així doncs sembla que PDX1 interviendria en la regulació del promotor de IAPP a través d'almenys dues de les caixes A.

4.4. Transportador de la glucosa 2

GLUT2 és una proteïna de membrana que facilita la difusió de la glucosa a través de la membrana plasmàtica de les cèl.lules dels mamífers. GLUT2 s'expressa en el fetge, intestí prim, ronyó, en algunes àrees restringides del cervell i en les cèl.lules β del pàncrees. En animals amb diabetis, la manca de secreció d'insulina es troba correlacionada amb una reducció de l'expressió de *GLUT2* en les cèl.lules β , però no en les cèl.lules del fetge o del ronyó; això indicaria que la regulació de *GLUT2* en el pàncrees es dona per algun mecanisme de regulació diferent. S'ha identificat un motiu repetit TAAT (5'-TAATAATAACA-3') en el promotor de *GLUT2*, que es troba conservat en ratolí i humà, on s'uneix PDX1 transactivant l'expressió de *GLUT2*.

4.5. Glucocinasa

L'expressió més elevada de glucocinasa es dona en el pàncrees i en el fetge (Schuit et al. 2001). És un factor crucial per a transferir fosfats de l'ATP a la glucosa, generant glucosa-6-fosfat, que és el primer pas limitant del metabolisme de la glucosa. En el promotor de la GK es troba un motiu semblant a les caixes A, anomenat hUPE3, que és capaç d'unir tan BETA2/NeuroD, com PDX1, que activen la seva transcripció (Moates et al. 2003).

Objectius

Objectius

El nostre grup està interessat en l'estudi dels gens ParaHox en ratolí i les seves possibles implicacions en la regulació del gen de la insulina. El treball realitzat en aquesta tesi té dues etapes diferents marcades per l'aparició de la seqüència pública del genoma humà i, poc després, la de ratolí. Com ja ha estat esmentat, el *cluster* ParaHox fou duplicat a l'origen dels vertebrats, deixant una dotació gènica de tres gens *Cdx*, dos gens *Gsh* i un gen *Pdx* (*IPF*). Segons les hipòtesis de duplicacions gèniques podria haver-hi fins a quatre gens de cada classe.

El gen *Pdx1* codifica per un factor de transcripció clau per al correcte desenvolupament del pàncrees, i en la transició secundària per la formació i el manteniment del fenotip de cèl.lula β . A més, és un dels principals factors de transcripció implicats en la regulació de la transcripció de la insulina. Es va plantejar si una d'aquestes dues funcions que *Pdx1* té en el pàncrees, podia ser duta a terme per un possible *Pdx2* (*IPF2*), que podria tenir una expressió solapada amb *Pdx1* i possiblement funcions parcialment redundants.

Per altra banda, degut al parcial solapament d'expressió que tenen els gens ParaHox en l'embrió i la manca de dades sobre la seva expressió en adult, es va trobar interessant estudiar la seva expressió en teixits adults i principalment en el pàncrees, degut a la possible implicació que podria tenir en l'homeostasi de la glucosa i, per tant, en la diabetis. Tanmateix es volia veure si les proteïnes ParaHox podien unir-se en el promotor de la insulina i modificar-ne la seva transcripció.

En concret, els objectius proposats són:

1. Cerca de gens relacionats amb *Pdx1* (identificació d'un possible *Pdx2*) a partir de genotèques de cDNA de pàncrees i PCR sobre cDNA de pàncrees i DNA genòmic.
2. Estudi de l'expressió dels gens ParaHox en teixits adults i en diferents estadis del desenvolupament embrionari, utilitzant panells de cDNA de diferents teixits amb la tècnica de RT-PCR i hibridacions *in situ* sobre seccions de pàncrees adult.
3. Si s'escau, immunohistoquímica sobre les mateixes seccions per veure en quin tipus cel.lular pancreàtic s'expressen els gens ParaHox.
4. Clonatge de tots els gens ParaHox en vectors d'expressió i cotransfeccions d'aquests gens amb el promotor de la insulina en cultius cel.lulars de cèl.lules α i β per estudiar la seva possible acció reguladora sobre el promotor del gen de la insulina, utilitzant el gen *reporter* de la luciferasa.

Resultats

Capítol I

Capítol I

CERCA DE GENS SIMILARS A PDX EN EL GENOMA HUMÀ

Resum

Per a totes les estratègies d'amplificació es va comprovar, com a control positiu, l'amplificació de *Pdx1*. Per tal d'identificar els putatius gens *Pdx* duplicats en el genoma humà es van dissenyar uns oligonucleòtids degenerats per comparació dels dominis homeòtics dels gens de la família *Pdx* en diferents espècies. Els motllos utilitzats en les PCRs varen ser:

- 1) DNA genòmic humà
- 2) Una barreja de cDNAs de 37 teixits humans.
- 3) Una barreja de cDNAs de fetus.
- 4) Una genoteca de cDNA de pàncrees humà.

Es van fer diferents reaccions d'amplificació, utilitzant varies estratègies: *nested/semnested* PCRs, re-PCRs, PCRs en gradient i *anchored* PCR. La majoria de clons obtinguts en les diverses estratègies de PCR resultaren ser, majoritàriament, *Pdx1*, alguns gens *Hox* i proteïnes pancreàtiques.

A la vegada, es realitzaren diferents triatges sobre una genoteca de cDNA de pàncrees humà en condicions de mitja restrictivitat, amb diferents solucions d'hibridació i rentats i emprant com a sonda diferents regions de l'*homeobox* de *Pdx1* humà o d'amfiox, prèviament amplificats per PCR o oligonucleòtids degenerats d'aquesta mateixa regió. A l'analitzar els clons positius es va veure que aquests corresponien a gens que codificaven per a diversos enzims i proteïnes pancreàtiques, tals com el precursor de la proteasa pancreàtica E, quimi tripsinògen B1, tripsina 2, alguns *Hox* i *Pdx1*.

El fet d'aïllar gens *Hox* era indicatiu de que s'havia arribat a unes condicions de restrictivitat prou baixes, ja que els gens *Hox* són menys semblants a *Pdx1* del que ho seria un possible *Pdx2* i que per tant, possiblement no existia un nou gen similar a *Pdx* en el genoma humà.

Al mateix temps que es duia a terme tota aquesta cerca experimental, també es feien cerques per homologia de seqüència en el *Human Genome Working Draft Sequence*. Així doncs, després d'exhaustius intents d'identificar un nou gen similar a *Pdx1*, es va concloure que no existeix cap gen similar en el genoma humà, fet que implicaria que després de les duplicacions gèniques a l'origen dels vertebrats, els possibles gens duplicats, excepte *Pdx1*, haurien degenerat i esdevingut pseudogens causant finalment, la seva desaparició del genoma, com a mínim, d'humà i ratolí.

Materials i mètodes

1. OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLÈICS

L'extracció de DNA a partir de sang humana es realitzà seguint el protocol descrit per Miller i col. (1988). Les minipreparacions de DNA plasmídic es realitzaren seguint el protocol descrit per Collet i col. (1997), o emprant el *kit* de minipreparacions de QIAGEN, seguint les instruccions del fabricant.

2. PCR. REACCIÓ DE POLIMERITZACIÓ EN CADENA

2.1. PCRs amb oligonucleòtids específics

Per tal de fer un control positiu sobre DNA genòmic humà, es van dissenyar uns oligonucleòtids específics de la regió de l'*homeobox* de *Pdx1*.

(**PDXF**: 5'GCGCACGGCCTACACGCGCGCA3' / **PDXR**: 5'TCGGGCGGCAACGGGGGCAGC3')

L'amplificació va ser realitzada en reaccions de 50 µl amb 200 ng de DNA motllo, 200 µM de dNTPs, 0'8 µM de cada oligonucleòtid, 1'5 mM de MgCl₂ i 1U Taq Platinum (*Invitrogen Life Technologies*). Després d'un pas inicial de desnaturalització de 2 minuts a 94°C, es va realitzar una PCR de 40 cicles amb tres passos: a 94°C durant 30 segons, 62°C durant 30 segons com a temperatura d'anellament i un pas d'allargament a 72°C durant 30 segons.

2.2. PCRs amb oligonucleòtids degenerats

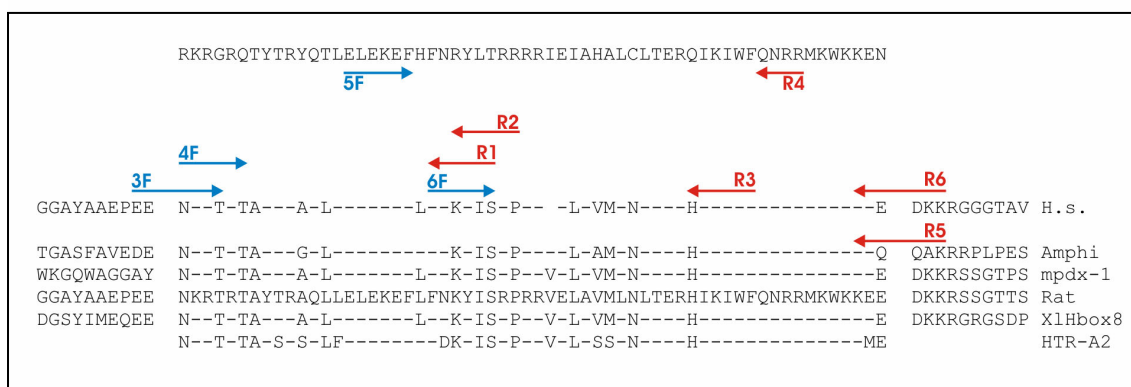


Figura 1. Encebadors dissenyats sobre l'alineament dels homeodominis de diferents paral·lels de IPF1/Pdx1. En blau, els encebadors en direcció *forward* i en vermell, els encebadors en direcció *reverse*.

Comparant els dominis homeòtics dels gens de la família Pdx en diferents espècies es van dissenyar uns oligonucleòtids degenerats per tal de poder amplificar un possible *Pdx2* sobre:

- 5) DNA genòmic humà.

- 6) QUICK-Clone cDNA PT1150-1 (PR89750 Clontech), que és una barreja de cDNAs de 37 teixits d'adult humans.
- 7) Marathon-Ready cDNA PT1156-1 (PR93378 Clontech), que és una barreja de cDNAs de teixits fetals humans.
- 8) λ TriplEx & λ TriplEx2 PT3003-1 (PR96139 Clontech), que és una genoteca de cDNA de pàncrees humà.

Taula 1. Encebadors degenerats emprats.

NOM	MOTIU	SEQÜÈNCIA
1F	SLFPWM	5' TNCCTTTYCCNTGGATG 3'
2Fa	WMKST	5' TGGATGAARAGYACNAA 3'
2Fb	WMKST	5' TGGATGAARTCNACNAA 3'
3F	EENKRT	5' GANGARAAAYAARNGNAC 3'
4F	NKRTRT	5' AAYAARMGNACHMGNAC 3'
5F	ELEKEF	5' GARYTNGARAARGARTT 3'
6Fa	FNKYIS	5' TTYAAYAARTAYATHTC 3'
6Fb	FNKYIS	5' TTYAAYAARTAYATHAG 3'
R1a	FNKYIS	5' GADATRTAYTTRTTTAA 3'
R1b	FNKYIS	5' CTDATRTAYTTRTTTAA 3'
R2a	KYISRP	5' GGNCKNGADATRTAYTT 3'
R2b	KYISRP	5' GGNCKRGADATRTAYTT 3'
R3	HIKIWF	5' AACCADATYTDDATRTG 3'
R4	WFQNR	5' CKNCKRTTYTGRAACCA 3'
R5	KEQQAK	5' TTNGCYTGYTCYTCYTT 3'
R6	KEEDKK	5' TTYTTRTCYTCYTCYTT 3'

Es van fer diferents reaccions d'amplificació (amb variacions sobre la reacció estàndar) amb rangs de temperatura d'anellament variant entre 45°C i 70°C, diferents concentracions d'oligonucleòtids, entre 0'5 μ M i 2 μ M, diferents concentracions de magnesi, entre 1'5 mM i 6mM, i enzims com Taq (*Promega*), ExTaq (*Takara*) i Taq Platinum (*Invitrogen Life Tehnologies*). Les estratègies emprades varen ser:

NESTED/SEMINESTED PCRs, que consisteixen en dues reaccions de PCR consecutives amb dues parelles d'oligonucleòtids (dos interns i dos externs) o bé, en una parella d'encebadors més un oligonucleòtid intern extra.

RE-PCRs, que consisteixen en segones reaccions de PCR sobre una alíquota d'una primera reacció, emprant els mateixos oligonucleòtids per ambdues amplifícacions.

PCR de gradient, on hi ha una gradació línia de la temperatura d'anellament en sèries de reaccions.

Anchored PCR, PCRs emprant d'una banda, un dels oligonucleòtids degenerats de regions codificants internes al gen i, de l'altre, un dels oligonucleòtids específics dels braços del fag λ . Aquesta estratègia es va utilitzar sobre els següents DNAs motllo: Marathon-Ready cDNA PT1156-1 (PR93378 Clontech) i λ TriplEx & λ TriplEx2 PT3003-1 (PR96139 Clontech).

Després de fer diverses PCRs sobre Marathon-Ready cDNA, emprant diferents combinacions d'encebadors degenerats, bé amb 5'RACE o bé 3'RACE:

5' RACE: 5' GGTCTTACTCCTTGGAGGCCATGT 3'

3' RACE: 5' GACCCCTTCATTGACCTCAACTAC 3'

finalment, la PCR quedà posada a punt amb les següents condicions i utilitzant els primers 4F/3'RACE a una concentració de 0'2 μ M i una concentració de magnesi de 1'5 mM. La PCR constava de 40 cicles amb 40 segons de desnaturalització a 94°C, 2 minuts d'anellament a 60°C i 3 minuts d'elongació a 72 °C.

Sobre la genoteca de cDNA de pàncrees, s'utilitzaren també diferents combinacions d'encebadors degenerats amb els encebadors del kit λ TriplEx & λ TriplEx2 PT3003-1:

(**5' seq:** 5' TCCGAGATCTGGACGAGC3' / **3' seq:** 5' TAATACGACTCACTATAGGG3')

Es van fer dues PCRs consecutives amb les mateixes condicions que pel Marathon-Ready cDNA. La primera, amb la parella de primers 4F/3'seq, i la segona PCR, que era una amplificació *seminested*, amb la parella de primers 5F/3'seq.

3. TRIATGE DE GENOTEQUES DE cDNA DE PÀNCREES HUMÀ

Es realitzaren diferents triatges sobre una genoteca de cDNA de pàncrees humà (TriplEx & λ TriplEx2 PT3003-1 CLONTECH) en condicions de mitja restrictivitat (amb temperatures d'hibridació i rentats variant entre 45°C i 65°C), amb diferents solucions d'hibridació i rentats i emprant com a sonda diferents regions de l'*homeobox* de *Pdx1* humà o d'amfiox. Totes les sondes tenien una longitud aproximada d'entre 150-200 bp.

Tant les tècniques utilitzades, com la composició dels diferents tampons es troben íntegrament descrits a Garcia-Fernàndez (1992) i Minguillón (2002). El creixement de les cèl.lules d'*E. coli* XlBlue utilitzades per a la infecció, i les *E. coli* BM25.8 utilitzades per a la infecció i les escissions, s'han fet seguint íntegrament el protocol descrit en el manual del fabricant (TriplEx & λ TriplEx2 PT3003-1 CLONTECH). La transferència del DNA als filtres de niló, l'exposició i la detecció per autoradiografia es van fer seguint el protocol descrit a Sambrook and Russell, 2001.

Taula 2. Condicions dels triatges.

triatge	Nº clons	sonda	marcatge	hibridació	rentats
1	1'5 x 10 ⁶	Homeobox AmphiXlox	Random hexamer priming	50°C Tampó Church	50°C 2xSSC/0'1%SDS
2	1'5 x 10 ⁶	Homeobox AmphiXlox	Random hexamer priming	50°C Tampó Church	50°C 2xSSC/0'1%SDS
3	1'5 x 10 ⁶	Homeobox AmphiXlox	Random hexamer priming	65°C Tampó Church	65°C 2xSSC/0'1%SDS
4	1'6 x 10 ⁶	Homeobox IPF1(4F/3R)	Random hexamer priming	50°C Denhart's, 43% FA **	50°C 2xSSC/0'1%SDS
5	2 x 10 ⁶	F.ol/R.ol *	Marcatge terminal γ^{32} -P- ATP	45°C	TMAC 3M

*F.ol: 5' GARAAYAARCGNACNCGNACNGCN 3'

*R.ol: 5' NCGNGGNCGNSWDATRTAYTTRTT 3'

** Formamida

Els isòtops utilitzats per al marcatge de les sondes van ser α -³²P-dCTP (activitat específica 3000 Ci/mmol, concentració 10mCi/ml) per al marcatge de DNA de doble cadena; γ -³²P-dATP (activitat específica 7000 Ci/mmol, concentració 10mCi/ml) per al marcatge a 5' dels oligonucleòtids. Per a les sondes de doble cadena, es va utilitzar el marcatge per *random-hexamer priming* i la separació es va fer per precipitació diferencial; per als oligonucleòtids el marcatge es va fer amb T4 polinucleòtid kinasa i la separació, per cromatografia en Sephadex G-25. Els protocols seguits són bàsicament els descrits a Sambrook and Russell, 2001.

Per als marcatges necessitàvem entre 1-2x10⁶ cpm/ml de solució d'hibridació i aproximadament 0'2 ml de solució d'hibridació per cm² de filtre.

A la taula 2 es resumeixen les condicions de cada un dels triatges.

La composició de les solucions d'hibridació amb formamida i la del tampó Church es troben descrits a Sambrook and Russell, 2001.

Després de picar els fags positius, s'escindia el plasmidi integrat corresponent i s'utilitzaven per retransformar cèl.lules competents de la soca *E. coli* DH5 α , degut a que el DNA de les cèl.lules *E. coli* BM25.8 és de qualitat més baixa i, a vegades, presenta trencaments al DNA que compliquen la seqüenciació. Un cop fetes les minipreparacions per a l'obtenció del DNA

plasmídic amb DEPC (dietilpirocarbonat) seguint el protocol descrit per Collet i col. (1997), l'anàlisi dels positius es feia digerint el DNA dels clons amb *EcoRI/XbaI* per tal d'alliberar l'insert. Dels clons correctes es reobtenia el DNA plasmídic amb les columnetes de Qiagen, per tal de procedir a la seva seqüenciació.

4. SEQÜENCIACIÓ

Per seqüenciar els clons positius, en principi s'utilitzaren els oligonucleòtids específics per al vector pBluescriptSK (Statagene), *M13Forward* i *M13Reverse*. S'utilitzà el kit de seqüenciació de ABI3700 (AP Biosystems) amb les condicions establertes pel proveïdor.

Resultats

El gen *Pdx1* forma part del complex gènic de gens amb *homeobox* denominat complex ParaHox, que s'hauria duplicat a l'origen dels vertebrats. La hipòtesi de treball era, per tant, que existien, molt probablement, d'un a tres gens paràlegs de *Pdx1* en el genoma humà que no havien estat identificats a la data de l'inici d'aquest treball (recordem que aleshores no estava totalment seqüenciat el genoma humà i la seqüència disponible al banc de dades era escassa i fragmentària). Diferents arguments suggerien el per què aquests gens no havien estat aïllats fins aleshores. Entre aquests cal destacar:

i) no s'havien realitzat cerques exhaustives, a nivell molecular, d'homòlegs del gen *Pdx1* al genoma humà. Les tècniques d'amplificació amb oligonucleòtids degenerats havien estat realitzades amb cebadors que amplificaven majoritàriament gens Hox, abans que ParaHox. El clonatge de l'únic gen Pdx d'amfiox (*AmphiXlox*), similar a l'ancestre similar dels vertebrats, ha permès dissenyar cebadors específics per a tots els membres de la presumpta família gènica Pdx.

ii) els bancs de dades de seqüències EST dels que es disposava en aquell moment no eren suficientment informatius. Els gens ParaHox i en concret *Pdx1*, s'expressen a nivell molt baix, i en teixits o cèl.lules molt particulars. De fet, en aquell moment ni tan sols *Pdx1* havia estat aïllat a nivell de EST. Això feia probable que encara que existissin putatiu nous Pdx, aquests no apareguessin en els bancs de dades, ja que aquests podien estar esbiaixats cap a gens amb un major nivell d'expressió.

Així doncs, a continuació es resumeixen els resultats de la cerca realitzada en aquesta part de l'estudi, en base a la hipòtesi raonada a partir de l'anàlisi del genoma humà, l'origen de les duplicacions gèniques en els vertebrats i el descobriment del complex ParaHox.

1. PCRs. REACCIÓ DE POLIMERITZACIÓ EN CADENA

1.1. PCRs amb oligonucleòtids específics de *Pdx1*.

Com a control positiu, s'amplificà una banda d'aproximadament 300 bp, que fou clonada en un plasmidi pBluescript. S'obtingueren 6 clons, dels quals 3, després de ser seqüenciats i analitzats, resultaren ser *Pdx1*.

1.2. PCRs amb oligonucleòtids degenerats.

Qualsevol banda intensa de mida esperada o que es repetís en diferents reaccions, va ser clonada en el plasmidi pBluescript i els clons corresponents seqüenciats i analitzats utilitzant els diferents bancs de dades disponibles (Taula 3).

Taula 3. Resum dels clons obtinguts en l'estratègia de PCRs emprant oligonucleòtids degenerats.

MOTLLO	Nº PCRs	Minipreparacions	Seqüències
DNA genòmic	67	470	140
Marathon-Ready	9	144	102
Quick-Clone cDNA	10	53	20

1.3. Anchored PCRs

Després d'obtenir varies bandes utilitzant diverses combinacions d'encebadors degenerats amb 5'/3' RACE, es clonaren les bandes obtingudes en el plasmidi pBluescript i els clons corresponents foren seqüenciats i analitzats (Taula 4).

Taula 4. Clons obtinguts en l'estratègia de l'*anchored* PCR.

MOTLLO	NºPCRs	Bandes	Clons	Seqüències
Marathon-Ready	2	4	4	4
Lamda TriplEx	8	21	15	15

La majoria de clons obtinguts en les diverses estratègies de PCR resultaren ser majoritàriament *Pdx1*, alguns gens *Hox* i proteïnes pancreàtiques.

2. TRIATGE DE GENOTEQUES DE cDNA DE PÀNCREES HUMÀ

Les genoteques utilitzades eren de cDNA, perquè el que interessava era trobar un gen que fos actiu durant el desenvolupament del pàncrees o en la regulació del gen de la insulina. Un possible pseudogen no era interessant, en principi, perquè no realitza cap funció i no tindria, per tant, cap implicació en la diabetis o en el manteniment de l'homeostasi de la glucosa.

2.1. Triatge amb una sonda de l'*homeobox* de *AmphiXlox*

Els triatges sobre la genoteca de cDNA de pàncrees humana es realitzaren principalment, amb sondes obtingudes de la regió de l'*homeobox* del cefalocordat amfiox. Com ja s'ha esmentat abans, l'amfiox és considerat l'organisme viu més similar a l'ancestre comú de tots els vertebrats que no hauria patit les duplicacions del genoma. Així, tal com va ser descrit (Brooke et al. 1998) l'amfiox presenta un *cluster* ParaHox format pels gens *Cdx*, *Xlox*, *Gsx*. Així doncs, els

putatius nous Pdx que es poguessin trobar en el genoma humà, s'haurien duplicat a partir d'un únic gen ancestral semblant a *AmphiXlox*. Aquests gens duplicats haurien pogut seguir camins diferents al llarg de l'evolució a base d'acumular mutacions, fet que comportaria que un putatiu nou gen IPF seria més semblant al seu ancestre (similar a *AmphiXlox*), que no pas al seu gen paràleg germà (possible *Pdx2*). Per aquesta raó, els triatges inicials es van realitzar amb sondes de entre 150-200 bp fetes a partir de l'*homeobox* del gen *Xlox* de l'amfiox.

1er triatge) S'obtingueren 286 positius dels quals es seleccionaren 48 i, d'aquests, es purificaren i seqüenciaren 43. Tots els clons van resultar ser falsos positius.

2on triatge) S'obtingueren 23 positius dels quals 20 es van escindir i es van seqüenciar amb els encebadors M13F i M13R.

El resultat de les seqüències, tant pel primer com pel segon triatge, va ser similar. Seqüències de gens que codifiquen per a diversos enzims i proteïnes pancreàtiques, tals com el precursor de la proteasa pancreàtica E, quimiotripsinògen B1, tripsina 2, alguns Hox i *Pdx1*. En veure que alguns dels positius corresponien a diversos enzims pancreàtics i a gens Hox, es va pensar que el problema podia ser que s'estigués treballant a unes condicions de rigurositat massa permissives. Per això es va decidir fer un següent crivellatge augmentant la temperatura d'hibridació.

3er triatge) Aquest va ser realitzat a una temperatura de 65°C i amb una sonda de l'*homeobox* d'*AmphiXlox* obtinguda amb els oligonucleòtids 5F/3R. S'obtingueren dos positius que resultaren ser *Pdx1*.

2.2. Triatge amb una sonda de l'*homeobox* de *Pdx1* humà

En vista del poc èxit obtingut en els triatges realitzats amb la sonda d'amfiox, es va decidir preparar una nova sonda, aquesta vegada de la regió de l'*homeobox* del mateix *Pdx1* humà. La sonda obtinguda feia 175 bp.

Es van obtenir 5 positius, 2 dels quals eren dubtosos, i que es perderen en el retriatge. La seqüència dels 3 positius restants resultaren ser *Pdx1*, precursor de la insulina i una serina proteasa.

2.3. Triatge amb oligonucleòtids

Es va fer una hibridació amb l'oligonucleòtid Fol, una altra amb Rol. I finalment una última hibridació amb una barreja dels dos oligonucleòtids.

Es van obtenir 16 positius bastant dubtosos ja que cap replicava en la hibridació feta amb la barreja d'oligonucleòtids. Tot i així es va continuar i, en el primer retriatge, els 16 positius van ser finalment catalogats com a falsos positius.

3. CONCLUSIONS

Aquestes estratègies basades en una possible conservació de seqüència entre gens duplicats, conduí a l'aïllament, repetides vegades, del gen *Pdx1*, així com diversos gens Hox i d'altres gens ja coneguts i expressats en pàncrees adult (p.ex: enzims pancreàtics) o a seqüències no codificants o amb similituds només casuals amb les sondes o encebadors emprats. Les condicions emprades per realitzar els triatges van abarcar un rang ampli de condicions de restrictivitat. Finalment, el fet d'aïllar gens Hox era ja indicatiu de que s'havia arribat a unes condicions de restrictivitat massa baixes, ja que els gens Hox són menys semblants a *Pdx1* del que ho seria un possible *Pdx2*. Aquesta observació també era recolzada pel fet de que, tot i que *Pdx1* s'expressa de forma molt més restringida, també és així per alguns dels gens Hox que es van aïllar, fet que indicava de nou que la restrictivitat a la que s'havia arribat era prou baixa i que per tant, possiblement no existia un nou gen similar a *Pdx*.

Al mateix temps que es duia a terme tota aquesta cerca experimental, també es feien cerques per homologia de seqüència en el *Human Genome Working Draft Sequence*. Així doncs, després d'exhaustius intents d'identificar un nou gen similar a *Pdx1*, es va concloure que no existeix cap gen similar en el genoma humà, fet que implicaria que després de les duplicacions gèniques a l'origen dels vertebrats, els possibles gens duplicats, excepte *Pdx1*, haurien degenerat i esdevingut pseudogens.

Capítol II

Capítol II

ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DELS GENS PARAHOX EN RATOLÍ

Rosanas-Urgell, A., Marfany, G., Garcia-Fernàndez, J. (2004). *Pdx1-related homeodomain transcription factors are distinctly expressed in adult pancreatic islets*. Submitted to FEBS letters.

Resum

Per tal d'analitzar l'expressió del gens ParaHox, es van realitzar RT-PCRs sobre un panell de cDNAs de ratolí que contenia diferents estadis del desenvolupament i diferents teixits adults. Es va observar que aquests gens s'expressaven en diferents estadis del desenvolupament embrionari i en un seguit de teixits adults no descrits prèviament. Aquestes observacions recolzen les diferents funcions que poden tenir aquests gens durant el desenvolupament i després en la diferenciació i manteniment de l'estat diferenciat de diversos òrgans en el ratolí adult.

Es van realitzar hibridacions *in situ* de tots els gens ParaHox en talls de pàncrees de ratolí adult i es va observar que tots ells s'expressaven en el pàncrees endocrí. Per tal d'avaluar quina era la seva possible implicació en la regulació de l'homeostasi de la glucosa, es van realitzar dobles immunodeteccions sobre les hibridacions *in situs* dels gens ParaHox, utilitzant marcadors de diferents tipus de cèl.lules endocrines. Aquest estudi va permetre concloure:

- i) que la majoria de gens ParaHox s'expressaven en les cèl.lules α dels illots pàncreatics.
- ii) que *Pdx1* s'expressava en cèl.lules β i que el seu mRNA -que no sempre colocalitzava amb la proteïna PDX1- podia trobar-se retintut en el nucli d'algunes cèl.lules.
- iii) que l'mRNA i la proteïna de PDX1 es trobaven colocalitzades amb el glucagó en algunes cèl.lules α de la perifèria.

Aquests resultats ens van permetre suggerir:

- i) que els factors de transcripció que participen en el desenvolupament embrionari, poden ser recrutats en l'adult, per realitzar funcions de diferenciació cel.lular i/o mantenir l'estat diferenciat en diversos òrgans.
- ii) que tots els gens ParaHox s'expressen en les cèl.lules α dels illots pancreàtics, probablement participant en alguna funció reguladora de la transcripció de gens diana.
- iii) que *Pdx1* podria estar sotmès a un procés de regulació postranscripcional que faria que el seu mRNA quedés retintut en el nucli d'algunes cèl.lules.

- iv) que *Pdx1* podria estar-se expressant a nivells basals en totes les cèl.lules endocrines del illots pancreàtics sota estratègies reguladores d'expressió diferents, funcionant com a capacitador i realitzant diferents funcions segons les interaccions proteiques que pogués tenir a cada tipus cel.lular.

Capítol III

***Pdx1*-related homeodomain transcription factors are distinctly expressed in adult pancreatic islets**

Anna Rosanas-Urgell, Gemma Marfany and Jordi Garcia-Fernàndez*

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona
Av. Diagonal, 645, E-08028, Barcelona, Spain

Complex gene networks are responsible for the proper operation of the endocrine pancreas. A central member of such networks, the homeodomain transcription factor PDX1, belongs to the ParaHox gene cluster, an array of Hox-like homeobox genes whose genomic linkage may well be retained by coordinate gene expression and sharing of regulatory mechanisms. We have investigated the expression profile of the rest of ParaHox cluster genes, *Cdx1*, *Cdx2/3*, and *Cdx4*, and *Gsh1* and *Gsh2*, in mouse adult tissues, and found that all of them are expressed in the endocrine pancreas. With a combination of mRNA *in situ* hybridization and immunodetection we have assigned their expression to specific islet cell types. To our knowledge, this is the first report that locates ParaHox genes other than *Pdx1* and *Cdx2/3* in a place as to be involved in the pancreatic transcriptional regulatory networks. ParaHox genes may become candidate target genes for future research towards the identification of new genes regulating glucagon-insulin homeostasis.

INTRODUCTION

The homeodomain transcription factor PDX1 (also named *IPF1* in humans, other aliases including *IDX1*, *STF1*, and *IUF1*) plays a crucial role during the embryonic development and differentiation of the endocrine pancreas. The most relevant trait of the *Pdx1* knockout mice is pancreas aplasia (Jonsson *et al.* 1994, Ahlgren *et al.* 1996). In humans, an homozygous mutation that generates a prematurely truncated PDX1 protein is also responsible for failure in pancreas formation (Stoffers *et al.* 1997). Besides, PDX1 is implicated in both the maintenance of δ -pancreatic cells differentiated state and the normal islet function (Ahlgren *et al.* 1998, reviewed in (Ashizawa *et al.* 2004). Indeed, point missense and frameshift mutations of *IPF1* in heterozygous human patients caused familial early-onset type 2 diabetes, namely MODY4 (Stoffers *et al.* 1997, (Ashizawa *et al.* 2004). Thus, *Pdx1*(*IPF1*) shows a dual action: it is an essential differentiation factor during pancreas embryogenesis, and it also acts as transcriptional regulator of normal pancreatic islet function and the maintenance of glucose homeostasis in the adult (Ahlgren *et al.* 1998).

Pdx1 was identified as a member of the ParaHox gene cluster (Brooke *et al.* 1998), an array of Hox-like homeobox containing genes that include *Gsh* and *Cdx* in addition to *Pdx1*. The ParaHox cluster is the evolutionary sister of the well-known Hox gene cluster.

Both gene complexes were originated around 550 Myears ago (Minguillon and Garcia-Fernandez 2003). Hence, the maintenance of the clustering in mammals ought to be explained by selective functional constraints, the best candidate being the sharing of common regulatory mechanisms so that coordinate gene expression is attained on the basis of genome vicinity, which, in addition, may engender functional redundancy. Concurrently, several rounds of large genomic segment duplications took place in the vertebrate lineage (Furlong and Holland 2002) leading in many cases to four syntenic duplicated segments or complexes. These syntenic regions followed distinct evolutionary patterns, eventually resulting in losses or gains of different genes in each duplicated segment. In the case of the ParaHox regions in mammals, the four segments were maintained, but only one ParaHox cluster remained fully intact, with one representative gene of each class: *Gsh1*, *Pdx1*, *Cdx2/3* (mouse chromosome 5), whilst only one gene remained in each of the other three segments, giving rise to the present *Cdx4* (mouse chromosome X), *Cdx1* (mouse chromosome 18) and *Gsh2* (mouse chromosome 5) genes (Minguillon and Garcia-Fernandez 2003).

A considerable amount of data has been gathered on *Pdx1*, the central ParaHox, but much less is known about the other ParaHox genes. Succintly, *Gsh1* (Valerius *et al.* 1995) and *Gsh2* expression has been mainly detected in the central nervous system, specifically in the developing brain and neural tube. *Gsh1* is relevant to the pituitary gland function (Li *et al.* 1996), whereas *Gsh2* plays a role in the specification of the olfactory bulb (Hsieh-Li *et al.* 1995). To our knowledge, no other function or expression data aside the nervous system has been reported for *Gsh* genes to date. Concerning caudal genes *Cdx1* and *Cdx2/3*, both play an important role in the early processes of intestinal morphogenesis and in the

*Corresponding Author:
Jordi Garcia-Fernàndez
Tel: +34 934037070. Fax: +34 934110969
e-mail: jgarcia@bio.ub.es

maintenance of the differentiated intestinal cell phenotype (Freund *et al.* 1998). Some functional redundancy between these two caudal genes has been proposed, although the *Cdx2/3* knockout is embryonically lethal. Mutations in either gene have been involved in colon tumour formation in humans and mice (Chawengsaksophak 1997). In addition, *Cdx2/3* is expressed in δ -pancreatic cells (Laser *et al.* 1996), in a physiologically opposite role to *Pdx1*, as it activates transcription of the glucagon gene. Finally, *Cdx4* expression has been reported only during embryogenesis, where it is detected in the most caudal regions of the early embryo (Gamer and Wright 1993).

Given the relevance of *Pdx1* in pancreas development, glucose homeostasis and diabetes, one of the most prevalent diseases in humans, the scarcity of knowledge of the potential involvement of other ParaHox genes in similar functions (except for some data on *Cdx2/3*) is rather perplexing. Considering: i) the clustering of ParaHox genes, that points to shared regulation, ii) the similarities of the homeobox sequence among them, which point to similar DNA targets, and iii) their common functions as transcription factors involved in both developmental and adult stages, we speculated whether all of them would be expressed and function in pancreas, regulating either similar or different functions as *Pdx1*. In agreement with this general lack of information on ParaHox genes, previous data of their expression in adult tissues were scanty or even missing. Here we show that ParaHox genes are expressed in many adult tissues, thus giving credence to other, yet unveiled, regulatory functions for these genes. Remarkably, all ParaHox genes are expressed in adult endocrine pancreas. Combining mRNA *in situ* hybridization and immunodetection of glucagon and insulin we have been able to assign their expression to specific islet cell types. Our results open new venues to the role of ParaHox genes in the transcription regulatory networks of the endocrine pancreas.

MATERIALS AND METHODS

Murine tissue panel RT-PCR

Multiple tissue cDNA panel was obtained from Clontech (BD Biosciences). Five ng of the first-strand cDNA (1 ng/ μ l) were used in two-step PCRs with each paraHox-specific oligonucleotides (see Table I). Cycling conditions were as follows: 94°C for 30 seconds, annealing and extension at 65°C for 2 min. Taking into consideration that we intended to detect transcription factors, which are usually low abundance transcripts and which, according to exhaustive transcriptome reports

(Holland, 2002); (Czechowski *et al.* 2004), go mostly undetected unless specific cycling conditions are used, we used 40 cycles, as reported. The PCR was performed in 50 μ l reactions with 0.4 μ M of each primer, 0.2 mM of dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 5% DMSO and 2.5 units of Taq polymerase (Promega). The amplified products were separated on an agarose gel and visualized with ethidium bromide.

In situ hybridizations

For *in situ* hybridization, adult mouse pancreas slides from the NIH Swiss strain were obtained from Novagen. Pancreas were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 7 μ m. Sections were washed (3 x 7 min) with xylene to remove paraffin, (2 x 3 min) with ethanol 100%, 3 min with ethanol 90%, 3 min with ethanol 70%, 3 min with DEPC-treated water, and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min. Sections were treated with 2 μ g/ml proteinase K for 30 min at 37 °C, washed (2 x 5 min) with phosphate-buffered saline, and postfixed with 4% paraformaldehyde. Acetylation with 0.1 M triethanolamine-HCl (pH 8.0) containing 0.25% acetic anhydride was performed for 10 min. Slides were subsequently washed, ethanol dehydrated, and air dried. High stringency hybridization was carried out overnight at 55°C in 50% formamide, 1X Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, 0.3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM NaH₂PO₄, and 200 μ g/ml salmon sperm DNA. The antisense and control sense riboprobes were used at a final concentration adjusted according to their size. For a detailed account, see Table 2. After hybridization, the slides were washed once in 2X SSC for 20 min, twice in 50% formamide, 2X SSC for 5 min at 45°C and equilibrated in NTE (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA) (three washes of 15 min at 37°C), followed by RNase A treatment (10 μ g/ml RNase A in NTE at 37°C for 30 min). Subsequently, the sections were washed in NTE for 15 min, twice in 2X SSC (15 min each at 37 °C) and twice in 0.1X SSC (15 min each at 37 °C), equilibrated in buffer 1 (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) and finally, blocked in blocking buffer (1% BSA, 0.1% Triton X-100 in buffer 1) for 30 min. An anti-digoxigenin-AP conjugate antibody (1:500; Roche Applied Science) in blocking buffer was incubated over night at 4°C. The sections were washed twice in buffer 1 for 15 min and once in buffer 2 (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 150 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) for 10 min, prior to exposure to the AP substrate, nitroblue tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (NBT-BCIP; Roche Applied Science). The reaction was stopped by several washes in

Table 1 • Forward and reverse oligonucleotides used to detect expression of each gene in the RT-PCR assays

GENE	FORWARD	REVERSE
<i>Pdx 1</i>	5' -GCTGGGATCACTGGAGCAGG-3'	5' -CTCGGGTTCCCGTGTGTAAGC-3'
<i>Cdx 1</i>	5' -TCCTGGCGCAGTCCCTCGG-3'	5' -CAGGGGCAGCTGTGTGGGAG-3'
<i>Cdx2/3</i>	5' -GCCGCCGAACAGCTGTCC-3'	5' -TGCCCTCTCGGAGAGCCCAAGTG-3'
<i>Cdx 4</i>	5' -GAGCCGTACAGCCCTAC-3'	5' -GAGAGTCACTTTGCACGGAAC-3'
<i>Gsh 1</i>	5' -AGACCTCTACCCGCTGCC-3'	5' -GAGCACTTGCAGCCTTGCGG-3'
<i>Gsh 2</i>	5' -GTCGGACCCACGGAGATTCC-3'	5' -CGCATAATGCGCCTGGCTACC-3'

Table 2 • Adjustment of the final riboprobe concentration used in the *in situ* hybridization assays, according to their respective size.

GENE	RIBOPROBE SIZE	FINAL CONCENTRATION
<i>Pdx1</i>	370 bp	11.5 pg/ 1
<i>Pdx1 sense</i>	370 bp	11.5 pg/ 1
<i>Cdx 1</i>	220 bp	21.5 pg/ 1
<i>Cdx 2/3</i>	550 bp	7.1 pg/ 1
<i>Cdx 4</i>	497 bp	8.6 pg/ 1
<i>Gsh 1</i>	338 bp	11.5 pg/ 1
<i>Gsh 2</i>	260 bp	21.5 pg/ 1

distilled water. The sections were cover-slipped with 70% glycerol in PBS x 1, and photographed using a Nomarski optics microscope (Axioplan, Carl Zeiss), equipped with a Nikon Coolpix Digital camera.

Immunodetection

Slides for immunodetection were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS). Nonspecific binding was blocked with PBST (PBS, 0,3% Triton X-100) and 2% BSA, twice for 30 minutes. Rabbit anti-glucagon (DAKO) (1:100), guinea pig anti-glucagon (Peninsula Laboratories) (1:200), guinea pig anti-insulin (Abcam) (1:200), rat anti-somatostatin (Chemicon International) (1:100), rabbit anti-PDX1 (1:400) were added to the sections and incubated overnight at 4°C. After 3 washes in PBST, another blocking step was performed with PBST and 2% BSA during 30 minutes. The secondary antibodies Cys3 anti-guinea pig (1:200) (Jackson ImmunoResearch), FITC anti-rat (1:200) and Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1:200), were added and incubated at RT for 2 hours. Slides were rinsed in PBST and mounted in fluorescence mounting medium Vectashield (Vector Laboratories). The DAPI staining (1:200 in PBS) was performed for 15 minutes at room temperature, and then rinsed twice with PBS. Images were obtained using fluorescence microscope Leica DMRB, equipped with a digital camera Cooled CCD Micromax format RTE 782-Y (Leica).

RESULTS

ParaHox gene expression in murine embryonic stages and adult tissues.

Most ParaHox gene expression studies have been performed on *whole mount in situ* hybridizations of embryonic stages. However, the expression data on adult tissues is scarce. As a first approach to analyze ParaHox gene expression, we performed RT-PCR in several adult tissues as well as in several critical embryonic developmental stages. To this end, we devised PCR gene-specific oligonucleotides, conveniently located in different exons as to avoid amplification of undesired genomic DNA contamination. PCRs were designed so that the conditions for all the genes were similar (see Material and Methods) and the amplified product sizes, around

300 bp. The results on the murine Multiple Tissue cDNA panel are shown in Fig.1.

During embryogenesis, *Cdx2/3* is highly expressed throughout all tested stages (7, 11, 15 and 17 days post-coitum, dpc), while the other ParaHox genes appear to be more temporally restricted. *Cdx4* is expressed mainly in the initial stages and declines through development as its expression is diminished at 15-days and is not longer detected at 17 dpc. In contrast, *Pdx1*, *Gsh1* and *Gsh2* expression appear later and remain at similar expression levels throughout the embryonic development. In particular, *Gsh2* shows a high level of expression that starts between days 7 and 11, in accordance to other reports (Hsieh-Li *et al.* 1995). Notably, *Cdx1* seems to be involved in differentiation, as its expression is detected only at the latest tested stage (17 dpc).

Interestingly, we detected expression of all ParaHox genes in distinct adult tissues. *Pdx1* is expressed, albeit at low levels, in spleen and testis. Of the caudal genes, *Cdx1* is expressed only in brain (very weakly), lung and muscle, *Cdx2/3* in brain (again faintly), testis, liver, lung and muscle, while *Cdx4*, the least studied of the ParaHox genes, is detected in all tested tissues, except muscle, and most strongly, in kidney. Noticeably, it is the only ParaHox gene detected in this organ. *Gsh1* and *Gsh2* share a similar tissular pattern of expression as they are detected at a high level in brain and at a moderate level in testis. According to these results, brain is the tissue where most ParaHox genes are expressed except *Pdx1*, and also testis, where all genes are detected except *Cdx1*. The only ParaHox gene expressed in all adult tissues analyzed is *Cdx4*.

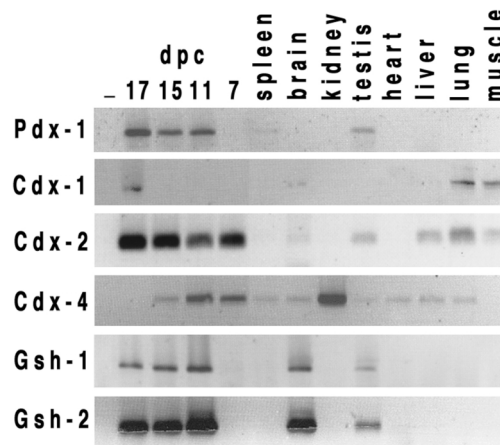


Figure 1 δ Detection of ParaHox gene expression on different mouse developmental stages (7, 11, 15 and 17 days post-coitum) and adult tissues.

ParaHox gene expression in mouse adult pancreas

In order to assess ParaHox gene expression in pancreas we performed mRNA detection by *in situ* hybridization on 7 µm-thin slices of mouse adult pancreas. All probes, designed to detect *Gsh1*, *Gsh2*, *Cdx1*, *Cdx2/3*, *Cdx4* and *Pdx1* (used also as a positive control) were highly specific for each gene and contained only coding sequence. Remarkably, all ParaHox genes showed

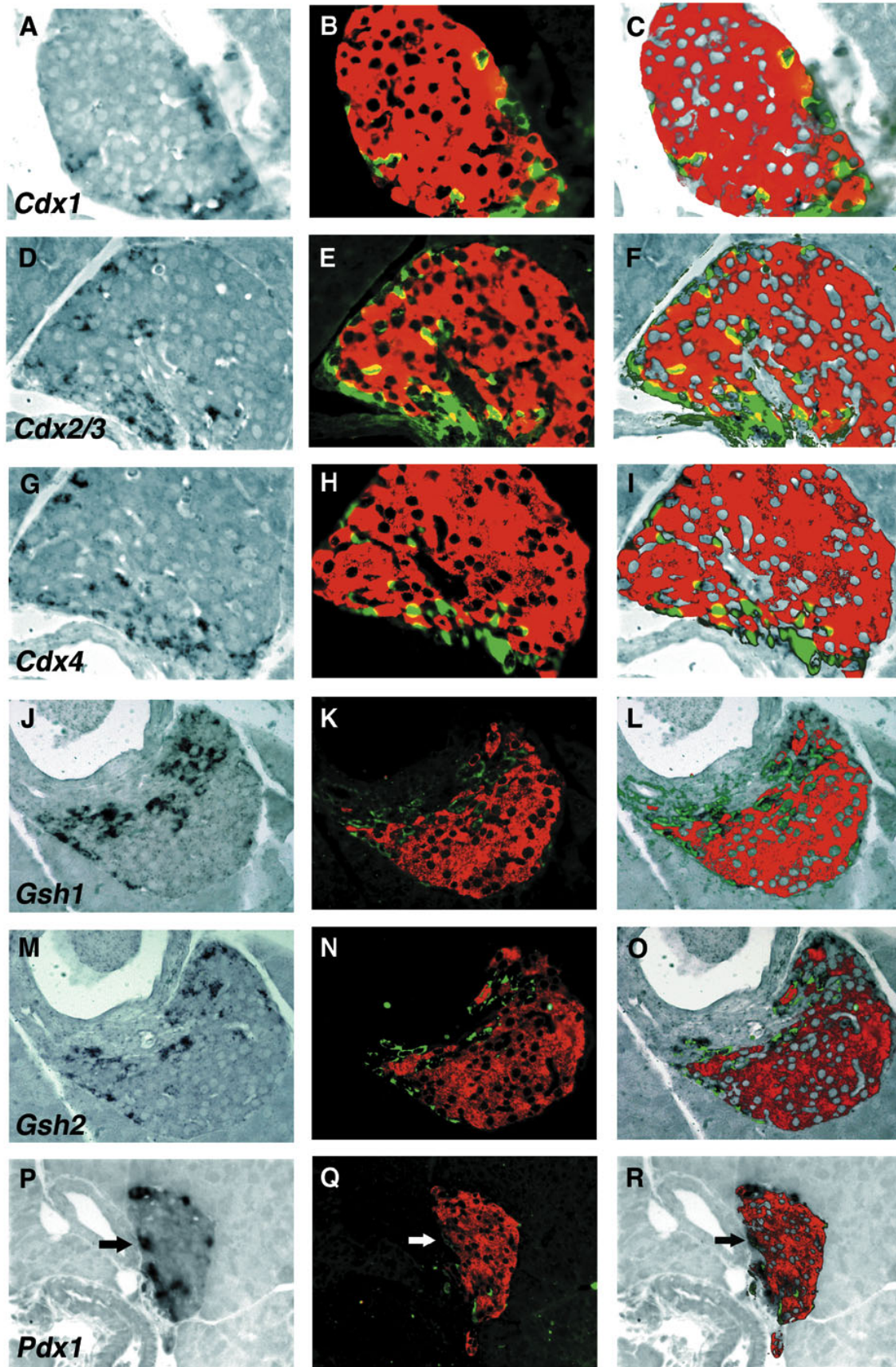
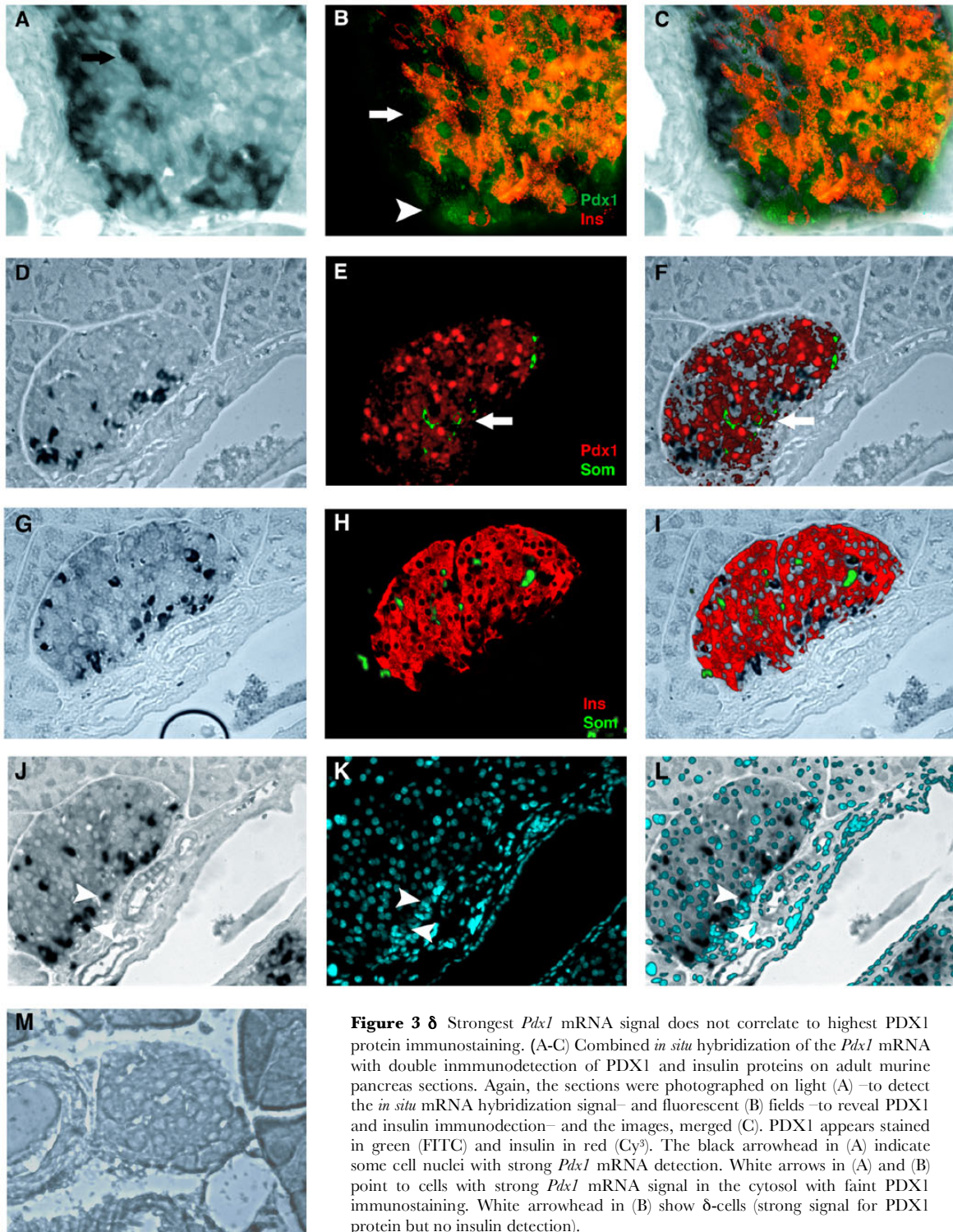


Figure 2 δ Combined *in situ* mRNA hybridization of each ParaHox gene with double immunodetection of glucagon and insulin on adult murine pancreas sections. For each gene and slide the sections were photographed on both, light (A, D, G, J, M and P) –to detect the *in situ* mRNA hybridization signal–, and fluorescent (B, E, H, K, N, and Q) fields –to reveal glucagon and insulin immunodetection–, and the images merged (C, F, I, L, O, and R). Glucagon appears stained in green (FITC) and insulin in red (Cy³). Arrows in (P-R) indicate strong *Pdx1* mRNA expression in non-insulin producing islet cells.



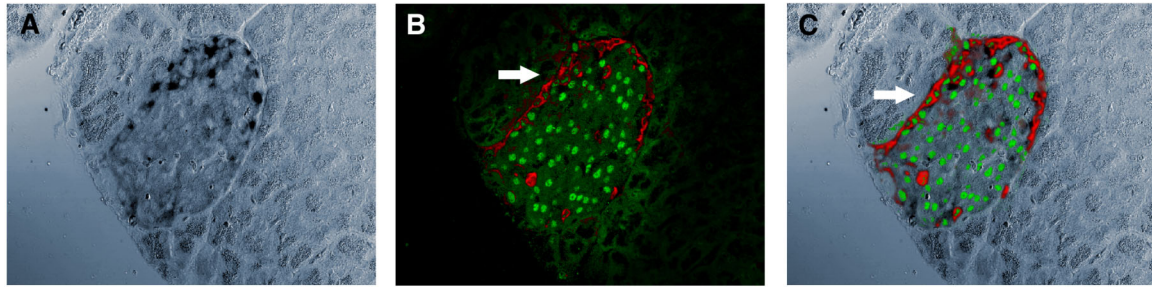


Figure 4 δ PDX1 is expressed in δ -cells. Combined *in situ* hybridization of the *Pdx1* mRNA with double immunodetection of PDX1 and glucagon proteins on adult murine pancreas sections. The sections were photographed on light (A) – to detect the *in situ* mRNA hybridization signal – and fluorescent (B) fields – to reveal PDX1 (green) and glucagon (red) immunodetection – and the images, merged (C). The white arrows reveal δ -cells (glucagon positive, red cytoplasm) with PDX1 protein localized in the nuclei (green).

endocrine-specific expression, although following different patterns (Fig. 2A, D, G, J, M and P).

Endocrine cells are grouped in islets, but four main cell types can be distinguished by the secreted products. We intended to assign particular ParaHox genes to specific cell types. Hence, subsequently to *in situ* hybridization we proceeded to immunodetect glucagon and insulin, the main products of δ - and δ -cells, respectively. These two techniques require different protocols and need to be optimized to use both on the same section. We were appealed by the combination of these two approaches by several reasons, but mainly because they have been hardly used in pancreas. In fact, most of the data on the literature, particularly for *Pdx1*, has been obtained by immunodetection of hormones as well as other transcription factors. The images produced on the same section by light and fluorescence microscopy, which corresponded, respectively, to *in situ* mRNA hybridization (Fig. 2A, D, G, J, M and P) and anti-insulin (red) and anti-glucagon (green) double immunodetection (Fig. 2B, E, H, K, N and Q) were merged (Fig. 2C, F, I, L, O and R).

Remarkably, *Cdx* and *Gsh* genes are all expressed in pancreatic endocrine islets. *Cdx2/3* expression in δ -cells (Fig. 2D, E, F) was expected, due to its role in the transcription regulation of the glucagon gene (JimDrucker 1996, (Laser et al. 1996). In addition, our data revealed that *Cdx1*, *Cdx4*, *Gsh1* and *Gsh2* showed a similar pattern to that of *Cdx2/3*: they were expressed in δ -cells and excluded from δ -cells (Fig. 2D, F, I, L, O), as a clear co-localization with glucagon-producing cells is detected. Notably, *Gsh1* and *Gsh2*, whose available expression data referred mostly to embryonic development and restricted to brain, are also expressed in endocrine pancreas (Fig. 2J-L and Fig. 2M-O, respectively).

Pdx1 expression was expected in δ - (insulin-producing) as well as in δ - (somatostatin producing) cells. Insulin-positive δ -cells (red in Fig. 2Q) were moderately positive for *Pdx1* mRNA (Fig. 2P) –which was localized in the cytosol–, in accordance to previous reports (Miller et al. 1994). Besides, we found strong *Pdx1* expression in non-insulin producing cells in the islet periphery (Fig. 2P-R, arrows). Some of these cells stained positive for glucagon (see below). The same results were obtained using two additional riboprobes that covered different *Pdx1* coding regions (data not shown). To gain deeper insights into the cell type distribution of *Pdx1*, a combined *in situ* *Pdx1* hybridization and double immunodetection of

PDX1 and insulin was performed (Fig. 3A-C). Colocalization of insulin with PDX1 protein was observed in the cytoplasm of all δ -cells (in orange as merged color in Fig. 3C), whilst only PDX1 protein was detected in the nuclei of these cells (in green), in agreement with its role as transcription factor (Fig. 3B). Green-only cells (arrowhead in Fig. 3B) most probably represented δ cells, as they produce PDX1 but not insulin. In order to confirm the latter, we performed double immunodetections with antibodies against PDX1 and the δ -cell marker somatostatin, onto the *Pdx1 in situ* hybridized slides (Fig. 3 D-F). As expected, some cells showed PDX1 expression localized in the nuclei and somatostatine in the cytoplasm (Fig. 3E-F, arrows). Additionally, co-expression of insulin and somatostatin was mutually excluded in endocrine cells (Fig. 3G-I), confirming the cell type specificity of the antibodies used and our previous results.

Yet, high levels of PDX1 protein do not correlate directly with high levels of *Pdx1* mRNA, as it becomes evident when merging the figures of light and fluorescence microscopes of (Fig. 3C, F, I). The hybridization signal in strong *Pdx1* mRNA-expressing cells seems mostly restricted to the nuclei (black arrow in Fig. 3A). This was further confirmed by DAPI counterstaining (Fig. 3J-L), where strong *Pdx1* mRNA signal quenches the blue-fluorescence of the DAPI dye (compare arrowheads of Fig. 3J-L). Some cells also show a strong signal for *Pdx1* mRNA in the cytosol but a faint immunostaining for PDX1 protein (white arrowhead in Fig. 3B).

Finally, the finding of *Pdx1* mRNA expression in δ -cells was unexpected (Fig. 2P-R). To further confirm this result, which would point to a putative role of PDX1 in δ -cells, we performed double immunodetections of PDX1 and glucagon on *Pdx1 in situ* hybridized slides (Fig. 4). These confirmed that strong *Pdx1* mRNA hybridization in the nuclei mostly localize with glucagon-producing cells, and that some cells in the islet were positive for both PDX1 and glucagon proteins (green nuclei and red cytoplasm, arrow in Fig. 4B-C).

DISCUSSION

Transcription factors involved in developmental processes can be also recruited (or co-opted) for functional maintenance or regulation of the differentiated

cells in the adult. Well-known examples of the latter are the Notch genes, but also *Pdx1*, which is pivotal for pancreas formation and later, for differentiation, maintenance and functional regulation of δ -cells. This proof of principle may hold true for most transcription factor genes, including ParaHox genes.

Within this context, it may be not so surprising that the main conclusion from our results is that all ParaHox genes are also expressed in many adult tissues. Some of them are nearly ubiquitously expressed (such as *Cdx4*) while others (i.e. *Gsh1* and *Gsh2*) appear to be more restricted, but clearly, besides their function in development, they must play other maintenance or regulatory roles, yet unknown. For example, *Cdx4*, which has only been reported in developmental stages, is expressed at different levels in most adult tissues, particularly, in kidney, thus being a good candidate to regulate some complex metabolic processes in renal tissue. *Cdx1*, instead, is detected in lung and muscle. Most Parahox, even *Pdx1*, are expressed in testis, but as many genes are expressed at basal levels in the germ line, its physiological relevance is yet to be determined. Overall, we surmise that many functional roles await to be assigned to the ParaHox genes.

We were particularly interested in their probably regulatory role in pancreas, related to the relevance of *Pdx1* function. Interestingly, all ParaHox genes are expressed in endocrine pancreas, albeit only *Pdx1*, directly involved in insulin transcription regulation, is expressed in δ -cells. *Pdx1* expression is regulated at many different levels. Among them, the phosphorylation of PDX1, as a response to the increase in glucose, allows the rapid translocation of the retained PDX1 from the cytoplasm to the nuclei, where it activates the insulin promoter (reviewed in (Ashizawa et al. 2004). Remarkably and according to our results, *Pdx1* mRNA and protein levels do not directly correlate, highlighting that other post-transcriptional regulation processes, such as mRNA export from nucleus to cytoplasm, may control PDX1 production and function, as it happens to other finely-tuned regulated genes showing successive layers of regulation that function as cellular checkpoints (Cole & Saavedra 1997, Ruvolo et al. 2001, Hodge et al. 2002). This lack of correlation between mRNA and protein levels is in accordance to other reports of *Pdx1* expression in pancreatic duct and duodenum cells (Miller et al. 1994, Sharma et al. 1999, (Stoffers et al. 1999), and suggests that *Pdx1* expression is regulated at many levels, probably as a response to different metabolic signals, being even more complex than believed. Hence results on the regulation of *Pdx1* expression based merely on mRNA production or in protein detection should be interpreted cautiously. In this context, our finding that *Pdx1* is expressed in δ , glucagon-producing cells, adds a further node in the transcriptional regulatory network of the endocrine pancreas.

All the rest of ParaHox are strongly expressed in δ -cells and should consequently play an important role in these islet cells. *Cdx2/3* has already been claimed to regulate the glucagon gene transcription. Whether the other caudal and *Gsh* genes are also directly involved in glucagon transcriptional regulation, participate in the glucagon-insulin homeostasis or regulate other genes not related to hormone production, i.e., to maintain the differentiated δ -cell state, remains to be elucidated. In this context, a recent report on HNF transcription factors required to differentiate hepatocytes and pancreatic islet

cells, describe a complex network of transcription factor interactions that activate and regulate most of the genes needed for the differentiated state (Odom et al. 2004, (Kulkarni and Kahn 2004). Most target genes are beginning to be drawn but many players of the network, acting at different levels of the regulatory loops and nets are yet to be identified, most probably because they are expressed at very low levels on a restricted spatio-temporal window. We postulate that ParaHox genes may well be key components of these networks, although not necessarily holding a position similar to that of *Pdx1* in δ -cells.

Future work is needed to clarify the position and role of the ParaHox cluster, the individual genes as well as the cluster itself as a genome entity, in endocrine pancreas function. It is tempting to speculate that, similarly to *Pdx1*, alterations of either the rest of Parahox genes, more modestly studied, or the global regulatory elements of the ParaHox cluster, contribute to impaired global glucose homeostasis, hence to one of the most prevalent human diseases, diabetes.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Max Rubert for technical advise in the photograph imaging. We are also grateful to Dr. H. Edlund and Dr. E. Muntanya for the kind gift of the polyclonal antibodies against PDX1 and glucagon, respectively. We thank the Servei Científic-Tècnic de la Universitat de Barcelona for the use of the ABI PRISM 3700 Sequencer, the in situ hybridization facilities and the use of the confocal microscope. This work has been funded by grants 990610 (Fundació La Marató de TV3), and BMC2002-03316 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) and by the Departament de Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Distinció per la Promoció de la Recerca Universitària).

REFERENCES

- Ahlgren U, Jonsson J & Edlund H 1996 The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* **122** 1409-16.
- Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K & Edlund H 1998 beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes and Development* **12** 1763-8.
- Ashizawa S, Brunnicardi FC & Wang XP 2004 PDX-1 and the pancreas. *Pancreas* **28** 109-20.
- Brooke NM, Garcia-Fernández J & Holland PW 1998 The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* **392** 920-2.
- Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Kötgen F & Beck F 1997 Homeosis and intestinal tumors in *Cdx2* mutant mice. *Nature* **386** 84-7.
- Czechowski T, Bari RP, Stitt M, Scheible WR & Udvardi MK. 2004 Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant Journal* **38** 366-79.
- Cole CN & Saavedra C 1997 Regulation of the export of RNA from the nucleus. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **8** 71-78.
- Freund JN, Domon-Dell C, Kedinger M & Duluc I 1998 The *Cdx-1* and *Cdx-2* homeobox genes in the intestine. *Biochemistry and Cell Biology* **76** 957-69.
- Furlong RF & Holland PW 2002 Were vertebrates octoploid? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* **357** 531-44.

- Gamer LW & Wright CV 1993 Murine *Cdx-4* bears striking similarities to the *Drosophila* caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mechanisms of Development* **43** 71-81.
- Hodge DL, Martínez A, Julias JG, Taylor LS & Young HA 2002 Regulation of nuclear gamma interferon gene expression by interleukin 12 (IL-12) and IL-2 represents a novel form of posttranscriptional control. *Molecular and Cellular Biology* **22** 1742-53.
- Holland MJ 2002 Transcript abundance in yeast varies over six orders of magnitude. *Journal of Biological Chemistry* **277** 14363-6.
- Hsieh-Li HM, Witte DP, Szucsik JC, Weinstein M, Li H & Potter SS 1995 *Gsh-2*, a murine homeobox gene expressed in the developing brain. *Mechanisms of Development* **50** 177-86.
- Jin T & Drucker DJ 1996 Activation of proglucagon gene transcription through a novel promoter element by the caudal-related homeodomain protein *cdx-2/3*. *Molecular Cell Biology* **16** 19-28.
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T & Edlund H 1994 Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371** 606-9.
- Kulkarni RN & Kahn CR 2004 Molecular biology. HNFs-linking the liver and pancreatic islets in diabetes. *Science* **303** 1311-2.
- Laser B, Meda P, Constant I & Philippe J 1996 The caudal-related homeodomain protein *Cdx2/3* regulates glucagon gene expression in islet cells. *Journal of Biological Chemistry* **271** 28984-94.
- Li H, Zeitler PS, Valerius MT, Small K & Potter SS 1996 *Gsh1*, an orphan Hox gene, is required for normal pituitary development. *The Embo Journal* **15** 714-24.
- Miller CP, McGehee RE, Jr. & Habener JF 1994 IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *The Embo Journal* **13** 1145-56.
- Minguillón C & Garcia-Fernández J 2003 Genesis and evolution of the *Evx* and *Mox* genes and the extended Hox and ParaHox gene clusters. *Genome Biology* **4** R12.
- Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI & Young RA 2004 Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* **303** 1378-81.
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL & Wright CV 1996 PDX1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122** 983-95.
- Ruvolo V, Gupta AK & Swaminathan S 2001 Epstein-Barr virus SM protein interacts with mRNA *in vivo* and mediates a gene-specific increase in cytoplasmic mRNA. *Journal of Virology* **75** 6033-41.
- Sharma A, Zangen DH, Reitz P, Tancja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF & Bonner-Weir S 1999 The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* **48** 507-13.
- Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL & Habener JF 1997 Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nature Genetics* **17** 138-9.
- Stoffers DA, Heller RS, Miller CP & Habener JF 1999 Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter. *Endocrinology* **140** 5374-81.
- Valerius MT, Li H, Stock JL, Weinstein M, Kaur S, Singh G & Potter SS 1995 *Gsh-1*: a novel murine homeobox gene expressed in the central nervous system. *Developmental Dynamics* **203** 337-51.

Capítol III

EXPRESSIONI DELS GENS DEL COMPLEX PARAHOX EN CULTIUS CEL·LULARS PANCREÀTICS α TC1 I β TC6

Over-expression of ParaHox genes in pancreatic cell cultures: effects on the insulin promoter regulation. Rosanas-Urgell A, Gracia-Fernàndez J, Marfany G. Submitted to BBRC.

Resum

Es van dissenyar i generar les construccions de tots els gens ParaHox en vectors d'expressió, per tal d'analitzar quin era l'efecte de la seva sobreexpressió sobre la regulació del promotor del gen de la insulina en cèl·lules pancreàtiques en cultiu. Per a la detecció d'aquest efecte es va generar una construcció amb un gen *reporter* molt sensible -el de la luciferasa- sota la regulació del promotor del gen de la insulina II de ratolí, per tal de cotransfectar-los amb el fragment del promotor de ratolí -645 bp INS-pGL3 amb el gen reporter de la luciferasa, en cultius de cèl·lules α TC1 i β TC6. Les cèl·lules es van recollir i analitzar a 48 h posttransfecció amb dues concentracions diferents de glucosa -alta concentració (25mM) i baixa concentració (0'5mM)-, per tal de veure quin efecte tenia sobre la unió dels diferents factors de transcripció sobre el promotor del gen de la insulina. Els vectors d'expressió que contenien les construccions dels gens ParaHox van ser transfectats a diferents concentracions, per veure si el seu efecte era o no dependent de dosi.

En les cèl·lules β TC6, GSH1 i GSH2 no tenien cap efecte significatiu sobre el promotor del gen de la insulina, tant a elevada com a baixa concentració de glucosa. CDX1 activava el promotor a elevades concentracions de manera independent de la glucosa. CDX2/3, a elevades concentracions, transactivava el promotor en presència de glucosa, sense diferències significatives quan no hi havia glucosa en el medi (igual per CDX4). En canvi, CDX4 en presència de glucosa provocava una forta inhibició dependent de dosi.

En les cèl·lules α TC1, GSH1 i GSH2 tampoc tenien cap efecte aparent i significatiu sobre la regulació del promotor del gen de la insulina, en ambdues concentracions de glucosa. CDX1 a elevades concentracions, l'activava moderadament en presència de glucosa i no produïa cap efecte visible sense glucosa. CDX2/3 tenia un efecte inhibidor en absència de glucosa, però no produïa cap efecte significatiu a 25 mM de glucosa. Inesperadament, l'efecte més significatiu era l'observat amb la sobreexpressió de CDX4, que en presència de glucosa, provocava una forta activació del promotor de la insulina a baixes concentracions de factor de transcripció i aquesta activació disminuïa a mesura que s'augmentava la concentració.

Aquests resultats suggereixen:

- i) que tal com describia la literatura, altres gens amb *homeobox* poden unir-se al promotor del gen de la insulina, activant-lo en alguns casos i inhibint-lo en d'altres.
- ii) que la funció dels diferents factors és depenen del tipus cel.lulars, fet que suggereix que la formació dels complexos proteïcs és depenent dels diferents factors que s'hi expressin.
- iii) La resposta que s'observava, era per alguns dels factors, depenent de glucosa. Aquest fet estaria indicant diverses possibilitats:
 - a) que el mateix factor sigui el que presenti una regulació directa per glucosa que l'activi per a la seva funció reguladora (com es dona en PDX1 a les cèl.lules β de l'adult).
 - b) que les proteïnes amb qui forma els complexos moleculars transcripcionals siguin depenents de glucosa, com també passa amb els factors que interaccionen amb PDX1 per regular el gen de la insulina.

En tot cas, podria estar indicant una possible funció fisiològica, depenent de glucosa, en la regulació transcripcional a les cèl.lules β i a les cèl.lules α , no només per PDX1 sino també per CDX4, CDX2/3.

Annex I

ParaHox genes in pancreatic cell cultures: effects on the insulin promoter regulation

Anna Rosanas-Urgell, Jordi Garcia-Fernàndez and Gemma Marfany*

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona
Avda. Diagonal, 645, E-08028 Barcelona, Spain

PDX1, one of the main transcription factors regulating the glucose-dependent transactivation of the insulin promoter in pancreatic β -cells, clusters with several closely related homeodomain-containing protein genes, all of them belonging to the ParaHox gene family. We have analysed the effects of the overexpression of the rest of the ParaHox genes (*Gsh1*, *Gsh2*, *Cdx1*, *Cdx2/3* and *Cdx4*) on the regulation of the insulin promoter in α - and β -cultured cell lines at different glucose concentrations and compared them to those of *Pdx1*. Several ParaHox transcription factors are able to transactivate or inhibit the insulin promoter, depending on the cell type and glucose concentration.

INTRODUCTION

In adult mammals, the insulin gene is expressed in the pancreatic β -cells of the islets of Langerhans. Studies performed using transgenic animals and transient transfections have shown that a few hundred basepairs (bp) upstream of the insulin transcription start site are necessary and sufficient to confer β -cell specific expression to an exogenous gene [1]. Mutational analysis of the promoter proximal region allowed the identification of several cis-acting enhancer elements that are relevant to the insulin transcriptional regulation. Most of these enhancer elements are well conserved in various species, suggesting the presence of common regulatory mechanisms controlling insulin expression [2]. Regulated insulin gene transcription relies on the recognition of several promoter sequence motifs by a combination of ubiquitous and islet-specific transcription factors that act synergistically [3]. The characterisation of such factors contributed to our current understanding not only of insulin gene expression, but also of endocrine pancreas development (reviewed in [4]).

A-boxes are determinant cis-regulatory elements in the insulin promoter. They contain AT rich sequences

-most of them contain the core TAAT sequence-, which are recognised and bound by homeodomain-containing proteins [1], among them, the pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX1) transcription factor. PDX1 homodimers, as well as other homeodomain proteins that bind to the A-boxes, cooperate with the bHLH dimers, which in turn bind to the closely located E-boxes, to activate insulin gene transcription [5]. The clustering of multiple transcription factor activation domains has a synergistic effect on transcription, since formation of an effective complex depends on all of the interacting proteins [4]. Hence, the net activity of the promoter can be regulated by altering the concentration or function of any of the proteins in the complex as well as by glucose, which regulates insulin gene transcription through multiple effects on several of the proteins in the transcription activation complex [6-11]. PDX1 is a crucial pancreatic transcription factor as it functions both in the early commitment of the primitive gut to pancreatic fate and in the maturation of β cells. Mainly expressed in the β -cells, PDX1 is also a major transactivator of the insulin gene. Remarkably, heterozygous mutations of the *Pdx1* gene are linked to a type of autosomal dominant diabetes mellitus known as maturity onset diabetes of the young (MODY4) [12].

The *Pdx1* gene was later classified as a member of the ParaHox cluster, an array of the Hox-like homeobox containing genes that include *Gsh* and *Cdx* genes in addition to *Pdx1*. The ParaHox cluster is an ancient evolutionary sister group of the Hox cluster [13]. These two gene complexes suffered several rounds of large

*Corresponding Author:
Gemma Marfany
Tel: +34 934035725. Fax: +34 934110969
e-mail: gmarfany@ub.edu

genome duplications in the vertebrate lineage, leading –in the case of the ParaHox in mammals– to four syntenic segments that were maintained, although only one ParaHox cluster remains fully intact. All Parahox proteins contain a similar homeodomain, and thus, bind DNA target sites and act as transcription factors. Besides *Pdx1*, not much data has been gathered on Parahox expression in pancreas, albeit CDX2/3 expression has been reported in α -cells, where it binds to the glucagon promoter and activates its transcription. In addition, and although this factor is not β cell-specific, CDX2/3 recognise the A3 and A4 boxes –usually bound by PDX1– and transactivate the rat insulin I gene [14]. In fact, most studies on Cdx and Gsh transcription factors were focused on their roles during embryonic development. Nonetheless, we have shown that all ParaHox genes are expressed in endocrine pancreas, in particular within the glucagon-secreting α -cells, except *Pdx1*, which is mainly detected in β - and δ -cells (Rosanas et al., in preparation). These results prompted us to further evaluate whether the ParaHox transcription factors could be involved in the regulation of glucose homeostasis, focussing on the presumptive effects upon the transcriptional regulation of the insulin promoter.

Hence, in this study, we have performed transient transfections on cultured α - and β - pancreatic-derived cells (α TC1 and β TC6) to analyse the effect of Parahox gene overexpression on the transactivation of a luciferase reporter gene driven by –600INS mouse promoter region. Our results provide new and quite unexpected insights into the regulation of the insulin promoter by homeodomain proteins other than PDX1, which are also expressed in the endocrine pancreas.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Tissue culture.

The β TC6 and α TC1 cell lines were obtained from ATCC (references CRL-11506 and CRL-2350, respectively), and all experiments were performed with cells between passage numbers 1 to 20. Cells were maintained following the manufacturer's recommendations. β TC6 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 4 mM L-glutamine, 1.5 g/l sodium bicarbonate, supplemented with 15% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin and streptomycin. α TC1 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 1.5 g/l sodium bicarbonate and supplemented with 15 mM HEPES, 0.1 mM non-essential amino acids, 0.02 % bovine albumin serum (BSA) and 10 % heat-inactivated fetal bovine serum. Two different glucose concentrations were used: 4.5 g/l and 0.1 g/l (25 mM and 0.5 mM glucose final concentration, respectively) depending on whether high or low glucose concentration was required for each experiment.

DNA constructs.

The expression vectors encoding PDX1 and CDX2/3 were generated by insertion of the full-length genomic sequences from the ATG to the STOP codons (including the corresponding genomic introns) into the pcDNA3 vector (Invitrogen). The expression vector encoding CDX4 was generated by insertion of the full-length coding sequence plus genomic intron 2 to the pcDNA3 vector. To this end, we used mouse genomic DNA as a template to amplify the first exon (from the initial ATG to the end of the first exon) and fused it to a second amplification product that stretched from the beginning of the second exon, including intron 2, until the end of the third exon. The strategy to clone the coding sequences of CDX1, GSH1 and GSH2 was as follows: we amplified each single coding exon, and subsequently, fused them in-frame; the reconstituted full-length cDNA was cloned into pcDNA3 and a synthetic intron from pIRESneo (BD Biosciences) was additionally cloned after the STOP codon at the 3' UTR of the expression vector.

A plasmid containing a –645 bp fragment of the mouse InsulinII promoter was cloned into the pGL3 basic vector (Promega) upstream of the luciferase reporter gene, using standard cloning methods. This promoter segment contains all the necessary and sufficient cis-regulatory elements required for the correct transcriptional regulation of the insulin gene in β -cells [1, 15].

All the constructs were verified by DNA sequencing with the ABI3700 sequencer (AP Biosystems).

Transfections.

Cells grown at about 80% confluence in twelve-well plates were transfected using 6 ml of Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen Life Technologies) following the manufacturer's recommendations with a total of 2.5 mg of DNA, in serum-free OptiMem medium (Gibco, Invitrogen Corporation). For standard transfections, and unless otherwise stated, cells were harvested 48 h after transfection.

In all the transfections, the quantity of the mouse insulin II promoter –645INS-LUC reporter construct was maintained constant at 0.5 mg. However, to analyse the effect of the overexpression of the ParaHox transcription factors, the expression constructs were cotransfected in increasing quantities: 0.25 mg, 0.5 mg, 0.8 mg, 1.2 mg, 1.5 mg, 1.8 mg and 2 mg for the β TC6 cell line and at 0.25 mg, 0.5 mg, 0.8 mg, 1.5 mg and 2 mg for the α TC1 cell line. The pSV- β Gal vector (0.2 mg) was also cotransfected to normalise the transfection efficiency. For each sample, at least four independently transfected replicates and duplicate values for each replica were obtained. Cells transfected with the –645INS-LUC vector but no transcription factor construct were used as positive controls and the value obtained was considered as the unity reference. Cells transfected with empty vectors were considered as negative controls. The β -galactosidase and luciferase activities were quantified using the *β -Gal Reporter Gene Assay chemiluminescent* (Roche) and the *Luciferase Assay Systems E1500* (Promega) kits, respectively, following the manufacturer's recommendations. Each luminescence

value, the ratio, mean average value and the standard deviation were obtained using the FB12 luminometer (Berthold Detection Systems) and the FB12 Sirius SW software (Berthold Detection Systems). Statistical significance was assessed by the Mann-Whitney test.

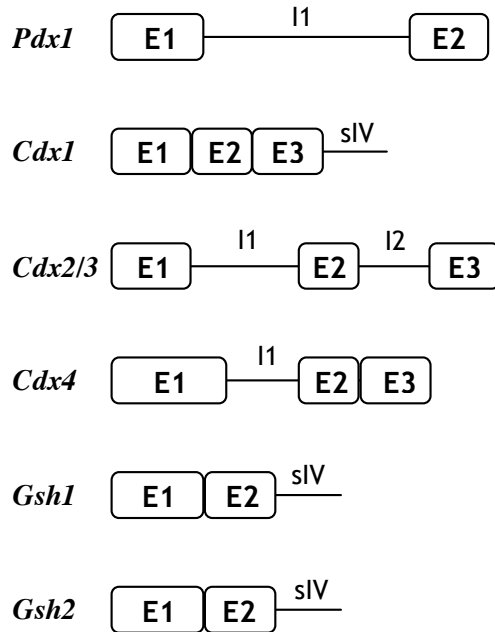


Figure 1 | Scheme of the ParaHox coding sequences cloned into the corresponding expression constructs. Exons and introns are represented by boxes and single lines, respectively. Note that all constructs contain an intron sequence in the transcribed region, either genomic, in the original position, or synthetic, in the 3'UTR. E1, E2, E3- exons 1, 2 and 3. I1, I2- genomic introns 1 and 2. sIV- synthetic intron from pIREsneo (IV stands for Intervening Sequence).

RESULTS

Obtention of the constructs to assess the effect of ParaHox gene overexpression on the insuling promoter transactivation

According to many previous reports, mRNA stability, nucleus/cytoplasm transport and even, mRNA translation efficiency, are related to mRNA maturation processes, in particular to the splicing events [16, 17]. Accordingly, many expression vectors designed to improve protein production in cultured cells or to produce stable transgenic organisms as well as gene therapy vectors do include introns in the 5' or 3' UTRs. Another alternative relies on the expression of coding sequences derived from genomic amplification, so that introns are embedded in their original location, and thus, should be appropriately processed in the recombinant transcript by the cellular splicing machinery. Considering this previous information and the fact that cDNA

amplification (using RT-PCR) of most ParaHox genes was hampered by their low and tissue-restricted expression, we decided to directly attempt genomic amplification. Whenever the intron sizes allowed it, we directly amplified from the initial ATG to the STOP codon. When the intron sizes were either excessive or unknown, we opted for amplification and in-frame fusion of single exons to obtain the complete coding sequence. In all the cases, at least one intron (either the original or synthetic) was included in the expression constructs. The final design of all the expression constructs is depicted in Fig.1. The integrity of the final constructs was verified by sequencing.

To assess the effect of the overexpression of the ParaHox genes on the insulin promoter activity, we relied on the highly sensitive luciferase reporter gene. The proximal mice genomic region upstream of the insulin transcriptional start site (around 400 bp) had already been shown to contain all the regulatory elements necessary to confer glucose-dependent regulation in cultured β -cell derived lines [18]. Hence, we cloned the proximal 645 bp – a slightly larger region than strictly required – from this promoter to drive the luciferase gene transcription.

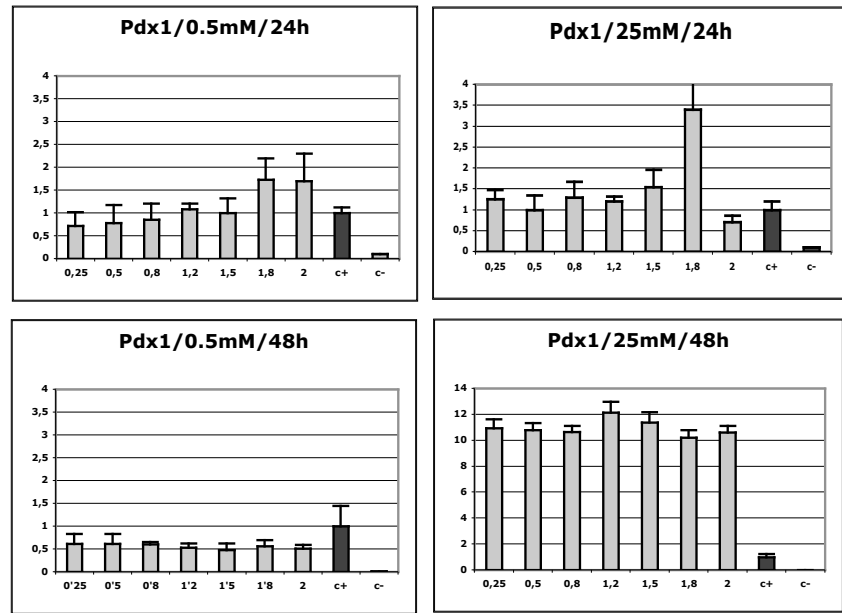
PDX1 overexpression in β -cells highly transactivates the insulin promoter at high glucose concentration at 48 h post-transfection

To set up the conditions of transfection and overexpression of the ParaHox constructs, we first evaluated the effects of PDX1 on β -cells under high glucose concentrations, as it is well known that, under these conditions, PDX1 is able to transactivate the insulin promoter [19, 20]. However, our preliminary attempts in transfecting β -cells with PDX1 as a positive control, analysed after 24 h, resulted in very low levels of activation (scarcely statistically significant), except in the transfections with high amounts of the expression construct (1.8 mg). Moreover, a differential response between cells grown at high and low glucose concentration could not be observed, in clear disagreement to the established PDX1 role in β -cells (Fig.2). We then surmised that 24 h might be too tight a time frame to analyse the effect of overexpression of transcription factors in the β -cell line used in our study.

To determine the post-transfection time needed to observe the effects of protein overexpression in the β TC6 cell line, we compared the results of PDX1 overexpression at either 24 h or 48 h post-transfection. As also depicted in Fig. 2, the results at 48 h agreed consistently with the reported effects of PDX1 upon the insulin promoter: at low glucose concentration, there is no activation (in fact, the excess of PDX1 inhibits very weakly the promoter), whereas at high glucose concentration, high transactivation levels were robustly detected (more than 10 fold), even at low DNA quantities of the construct expressing the transcription factor.

Taken together, these results confirm that overexpression of exogenous PDX1 greatly enhances transcription from the insulin promoter in β -derived cells (β TC6 cell line), and show that under our conditions, 48 h post-transfection were required to elicit an appropriate

Figure 2 | Effect of PDX1 overexpression on the insulin promoter in the β TC6 cell line at low (0.5 mM) or high (25 mM) glucose concentrations at either 24 h or 48 h post-transfection. The values on the x axis represent the increasing dose (in micrograms) of the PDX1 expression construct used in the transfections. The y axis represent the arbitrary transactivation values of the insulin promoter with respect to the positive control (c+), which is considered as 1. The standard deviation is also indicated. At least four independently transfected replicates of each sample were analysed. c+ - positive control (cells transfected with the -645INS-LUC construct alone). c- - negative control (cells transfected with empty vectors).



response to different glucose concentrations. Therefore, and in order to compare the effects of the overexpression of all the ParaHox genes, cells were all similarly treated and harvested at 48 h.

Overexpression of ParaHox genes in the β TC6 cell line.

Given that: i) all the ParaHox genes share similar homeodomains and thus, may bind to similar target motifs; ii) some of the ParaHox genes are linked to *Pdx1*, retaining the original genomic clustering and potentially sharing common regulatory elements and, iii) their unexpected expression in endocrine pancreas (Rosanas et al., in preparation), we aimed to evaluate the role of the ParaHox proteins as potential transcriptional regulators of the insulin gene. To this end, we overexpressed these proteins in β TC6 cell lines and monitored the activation of a cotransfected reporter plasmid containing the mouse insulin II gene promoter (-645 to -1), as aforementioned. The rationale behind the use of a β -derived cell line being the complex regulation of the insulin promoter, whose transactivation is the synergistic result of a combination of interacting transcription factors, which bind to a series of closely located cis-regulatory motifs. The transactivation factors are mainly pancreatic endocrine cell-type specific and some are activated or produced under high glucose concentration. Transfection on β -cells allowed us to test directly the effect of any ParaHox gene in an environment providing all the necessary partners and transcription machinery, including endogenous levels of

PDX1. In this context, our positive control, to which we have referred all transactivation values, is the basal transactivation level of the luciferase reporter gene driven by the insulin promoter, obtained without the overexpression of any transcription factor. The positive value observed for this control (c+) showed that the promoter was indeed bound and transactivated by endogenous protein complexes.

The results are summarised in the histogram diagrams of Fig. 3. All experiments were consistently repeated and replicated, and statistical significance of the observed differences was determined using the Mann-Whitney test. In summary, GSH1 and GSH2 overexpression resulted in inhibition of the promoter, more pronounced for GSH2, at high glucose concentration (Fig. 3), whereas CDX1 and CDX2/3 produced a more significant effect on the insulin promoter. CDX1, which acted in a glucose-independent manner, yielded around 2-fold increase in activity at the highest concentrations (Fig. 3). CDX2/3, instead, responded differently to glucose concentration, and while having no statistically significant effect at low glucose levels, it was able to transactivate the insulin promoter at high glucose concentration, in accordance to previous reports [21]. This effect was particularly observed when high amounts of the transcription factor construct were transfected (4.4-fold increase). In contrast, CDX4, which was also sensitive to glucose levels, produced the reverse effect to that of CDX2/3. Whereas at a low glucose concentration CDX4 overexpression did not affect the basal transcription of the insulin promoter, at high glucose concentration readily inhibited transcription to nearly null values in a transcription factor dose-dependent manner.

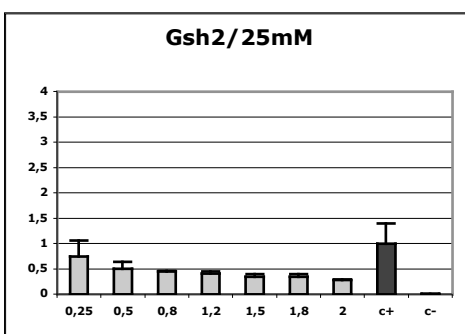
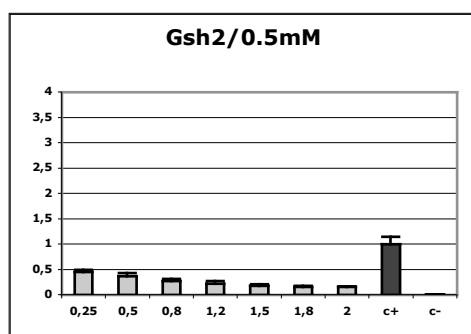
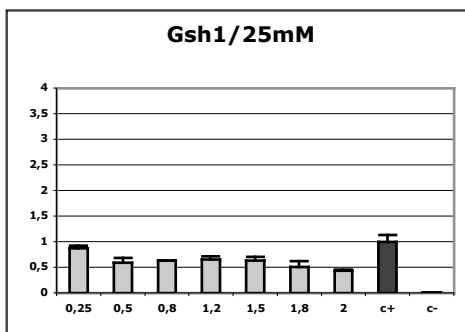
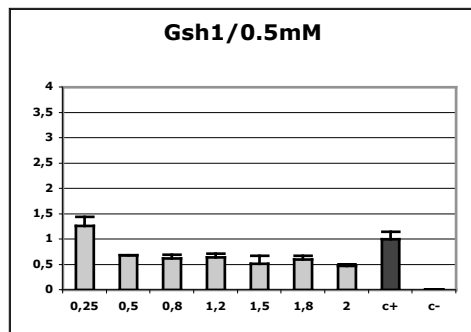
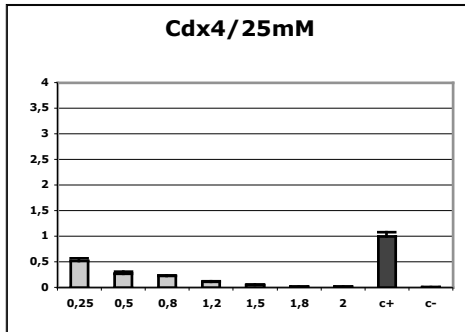
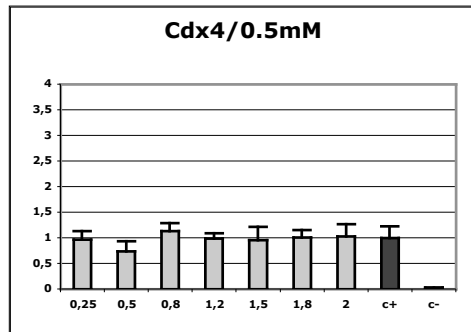
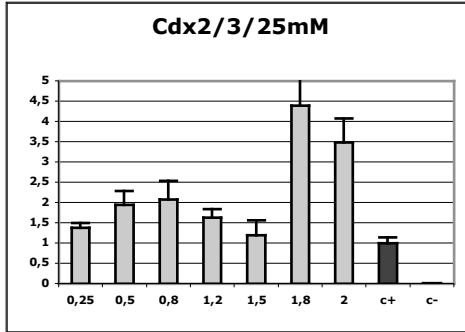
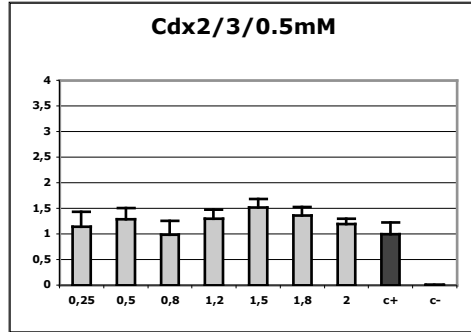
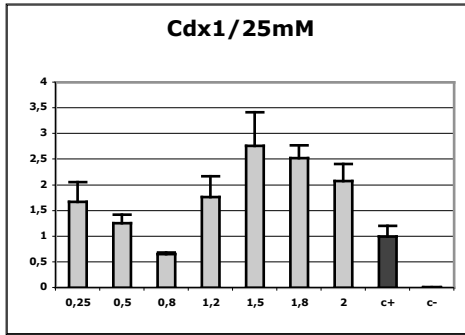
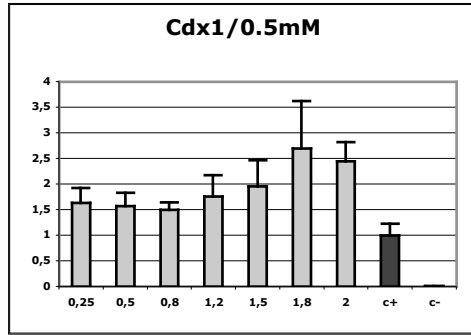


Figure 3 | Effect of ParaHox overexpression (except PDX1) on the insulin promoter in the β TC6 cell line at low (0.5 mM) or high (25 mM) glucose concentration, 48 h post-transfection. The values on the x axis represent the increasing dose (in micrograms) of each transcription factor expression construct used in the transfections. The y axis represent the arbitrary transactivation values of the insulin promoter with respect to the positive control (c+), which is considered as 1. c+- positive control (cells transfected with the -645INS-LUC construct alone). c- - negative control (cells transfected with empty vectors).

Overexpression of ParaHox genes in the α TC1 cell line.

All ParaHox genes are expressed in glucagon-producing α -cells of the endocrine pancreas, while PDX1 is the only ParaHox expressed in β -cells (Rosanas et al., in preparation). Taking into consideration these data and our results in β -cells, we next intended to evaluate the effects of the overexpression of the ParaHox genes on the insulin promoter in an α -derived cell line, which, on the one hand, is of endocrine origin, close to β -cells, sharing many transcriptional pathways and expressing similar transcription factors, but which, on the other hand, respond differently to glucose concentrations. In this respect, other authors have shown that the insulin promoter can be activated in α -cells after ectopic expression of PDX1 under high glucose conditions, thus demonstrating the presence of the coactivator partners required for the transcriptional regulation of the insulin gene [22].

The effects of the ParaHox overexpression on the regulation of the insulin promoter were assessed by transient transfections on the α TC1 cell line, similarly to those performed in β TC6 cells, and the results are summarised in Fig. 4. Overexpression of PDX1 in α -cells, at low glucose concentrations, resulted in a very low activation of the promoter, but only at high doses of the transcription factor construct (Fig. 4), while at high glucose concentration, the activation of the promoter steadily increased in a dose-dependent manner, reaching around 3-fold increase at the highest amount of transcription factor construct (Fig. 4). This result shows that, in the presence of glucose, PDX1 can transactivate the insulin promoter in α -cells, albeit at a much lower efficiency than in β -cells, in accordance to previous reports [22-24].

Again, GSH1 and GSH2 effects on the insulin promoter were not glucose dependent, and as shown for β -cells, their overexpression did not produce any remarkable effect on the insulin promoter activity, but for a general inhibition, which, in the case of GSH1, was dose-dependent (Fig. 4). CDX1 overexpression did not result in major changes on the insulin promoter activity, though at high glucose concentrations and at high transcription factor production, it weakly increased the activity from the insulin promoter (Fig. 4). Instead, CDX2/3 overexpression inhibited the insulin promoter at low glucose concentrations (Fig. 4). Interestingly, CDX4 again rendered the most unexpected result, as it was sensitive to glucose concentration and, at high glucose concentration, highly transactivated the insulin promoter, reaching 10-fold the value of the control. This effect was more pronounced at lower transcription factor doses. Noticeably, the effect of CDX4 overexpression in β -cells

at high glucose concentrations was just the reverse, while again not producing any effect at low levels of glucose.

DISCUSSION

As already stated, the overexpression of proteins in higher eukaryotic cells, mainly in mammalian cells, is highly dependent on mRNA stability and nucleocytoplasmic export. In this context, our strategy to include either one genomic or synthetic intron in each expression construct intended to guarantee the overexpression of the transcription factor, and not merely that of its RNA [16, 17].

According to our results, the effects of PDX1 overexpression on the insulin promoter in the β -derived cell line, at high glucose concentration, were modest at 24 h post-transfection. However, when cells were harvested at 48 h post-transfection, the transactivation effect of PDX1 over-expression was consistent and reached higher values, of more than 10-fold that of controls. Therefore, we set the conditions to assay the effects of overexpression of the other ParaHox genes in the same cell lines and using the same insulin-derived promoter construct at 48 h post-transfection. Most probably, this higher response at two days, was due to higher time of mRNA production or high protein stability, which may accumulate and hence, induce a higher insulin transactivation. Besides, high PDX1 production during such a period of time may also activate, in a positive feedback loop, other interacting transcription factors that synergistically act upon the insulin promoter [25, 26], thus eliciting a stronger and robust promoter response [14]. The fact that overexpression of one single transcription factor, PDX1, is sufficient to transactivate the insulin promoter, even when the binding of other coactivators are required to promote transcription, suggests that PDX1 may be a limiting transactivating factor in β cells, consistent with its finely-tuned regulation.

PDX1 was also able to activate the insulin promoter in a glucose-dependent manner in α cells, showing that many of the proteins required for transactivation and regulation of the insulin promoter are shared between α - and β -cells. However, the effect was much less pronounced than in β -cells, in accordance to previous reports [22, 23].

Concerning the rest of the ParaHox genes and comparing the results on β and α cells, in general, and not unexpectedly, the effects of their overexpression, either inhibiting or transactivating, are much more pronounced at high glucose concentration, probably reflecting the availability of other transcription factors or coactivators in these cells that respond to glucose concentration and bind to the insulin promoter. Given

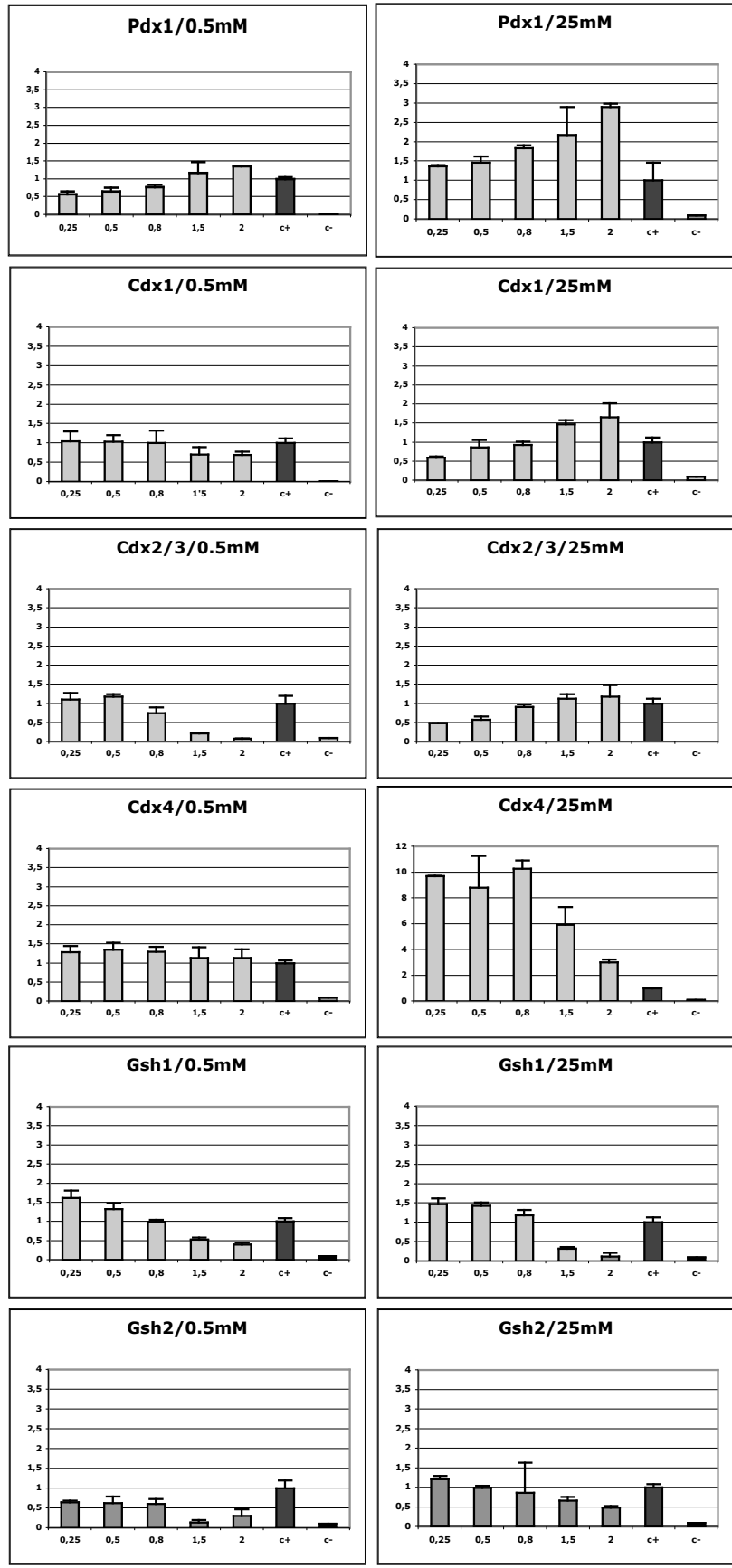


Figure 4 | Effect of ParaHox overexpression, including PDX1, on the insulin promoter in the α TC1 cell line at low (0.5 mM) or high (25 mM) glucose concentrations, 48 h post-transfection. The values on the x axis represent the increasing dose (in micrograms) of each transcription factor expression construct used in the transfections. The y axis represent the arbitrary transactivation values of the insulin promoter with respect to the positive control (c+), which is considered as 1. c+- positive control (cells transfected with the -645INS-LUC construct alone). c- - negative control (cells transfected with empty vectors).

that all these genes share a very similar homeodomain sequence, and probably bind similar sequences, our results are more easily interpreted in the view of differences in affinity binding and/or partner recruitment.

GSH1 and GSH2 did not appear to affect overtly the regulation of the insulin promoter, whereas the overexpression of Cdx proteins resulted in a more complex regulation pattern. Overall, GSH2 overexpression resulted in an inhibition of this promoter in β cells, depending on the transcription factor dose, but irrespective of glucose concentration. This inhibitory effect could be due to its interfering with target recognition by endogenous factors and/or sequestering of other endogenous coactivators and main transactivators, amongst them, PDX1. In fact, homeodomain-containing transcription factors usually act by assembling into homo- or hetero-oligomers. Different partners would shift recognition and affinity among different DNA motifs [14]. A similar inhibitory effect was observed when overexpressing GSH1 in α cells, again irrespective of glucose concentration (although low amounts of the GSH1 construct could transactivate very weakly the insulin promoter).

CDX1 overexpression did not visibly affect the transcription from the insulin promoter in α cells, while a two-fold transactivation response is clearly detected in β cells, even at low amounts of transfected construct, suggesting a conserved ability to recognise and bind targets at the insulin promoter. The weak transactivation effect and the fact that is glucose-independent, points to recruitment of glucose-independent, and probably non-synergic, transcription factors that are available in β - but not in α -cells.

CDX2/3 overexpression renders a different result in α or β cells, depending on glucose concentration, as in α cells the insulin promoter is clearly inhibited at low glucose concentration, whereas it is transactivated in β cells at high glucose concentration. These findings suggest that CDX2/3 binds to some insulin promoter motifs (in accordance to the reported binding to the A-boxes of the insulin promoter [21]), resulting in either inhibition or transactivation, depending on the recruitment and interaction to other transcription factors, which differ between these two cell lines. However, the ability to bind and transactivate the insulin promoter in β cells at high glucose concentration, when compared to that of PDX1, is moderate and highly dependent on the transcription factor dose, thus pointing to a reduced affinity for either the promoter targets or limited synergy with other required transcription factors.

Remarkably, CDX4 elicited a strong and completely reverse response compared to that of CDX2/3 in the two cell lines, or that of PDX1 in β cells. This effect of CDX4 overexpression was highly

dependent on glucose concentration and the cell type. In β cells, and only at high glucose concentrations, CDX4 strongly inhibited the insulin promoter to null activity. In contrast, CDX4 transactivated very efficiently (10 fold) the same promoter in α cells, while not affecting it, whatsoever, at low glucose concentrations. This effect was more pronounced at low doses of the transcription factor. Several scenarios would account for these results. First, CDX4 may recognise and bind directly one or several targets in the insulin promoter: in β cells, this binding would either prevent the binding of the endogenous transactivation factors, disrupt or sequester activating protein complexes or single proteins absolutely required for transactivation of the insulin promoter, or recruit inhibitory proteins. In this context, as PDX1 is a limiting factor in β cells, oligomerisation with excess of CDX4 could effectively deplete the PDX1 endogenous pools. Conversely, the response that CDX4 elicited in α cells, again indicated binding to particular motifs and, in this case, recruitment of α -cell specific transcription factors or coactivators, thus strongly transactivating the insulin promoter. In response to high glucose concentration, the transactivation effect of CDX4 overexpression in α cells reached the same levels of that of PDX1 in β cells. However, CDX4 showed a saturating effect at high transcription factor amounts, which was not observed with PDX1.

Our results showed that in β cells, no ParaHox could substitute efficiently PDX1 on the transactivation of the insulin promoter in response to glucose concentration, as CDX2/3 was able to do so only at high amounts of transcription factor construct, and CDX1 transactivated it moderately, but irrespective of glucose levels. Instead, if we consider the results on α -cells, CDX4 effectively transactivates the insulin promoter, providing a strong response dependent on glucose concentration, remarkably similar to that of PDX1 in β cells. Given that all ParaHox genes are expressed in adult pancreas, these results open new venues to explore α -cell-based therapy regarding glucose homeostasis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Servei Científic-Tècnic de la Universitat de Barcelona for the use of the ABI PRISM 3700 Sequencer. This work has been funded by the grant 990610 (Fundació La Marató de TV3) to J.G.-F and G.M., grant BMC2002-03316 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) to J.G.-F. and by the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Distinció per la Promoció de la Recerca Universitària) to J.G.-F.

REFERENCES

- [1] M. German, S. Ashcroft, K. Docherty, H. Edlund, T. Edlund, S. Goodison, H. Imura, G. Kennedy, O. Madsen, D. Melloul, The insulin gene promoter. A simplified nomenclature, *Diabetes* 44 (1995) 1002-1004.
- [2] F. Dandoy-Dron, E. Monthieux, J. Jami, D. Bucchini, Regulatory regions of rat insulin I gene necessary for expression in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 4925-4930.
- [3] S.Y. Shieh, M.J. Tsai, Cell-specific and ubiquitous factors are responsible for the enhancer activity of the rat insulin II gene, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 16708-16714.
- [4] D. Melloul, S. Marshak, E. Cerasi, Regulation of insulin gene transcription, *Diabetologia* 45 (2002) 309-326.
- [5] M.E. Massari, C. Murre, Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eukaryotic organisms, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 429-440.
- [6] M.S. German, L.G. Moss, W.J. Rutter, Regulation of insulin gene expression by glucose and calcium in transfected primary islet cultures, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 22063-22066.
- [7] D. Melloul, Y. Ben-Neriah, E. Cerasi, Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 3865-3869.
- [8] M.S. German, J. Wang, The insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucose, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 4067-4075.
- [9] B. Peers, J. Leonard, S. Sharma, G. Teitelman, M.R. Montminy, Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1, *Mol. Endocrinol.* 8 (1994) 1798-1806.
- [10] H. Odagiri, J. Wang, M.S. German, Function of the human insulin promoter in primary cultured islet cells, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 1909-1915.
- [11] M. Sander, S.C. Griffen, J. Huang, M.S. German, A Novel glucose-responsive element in the human insulin gene functions uniquely in primary cultured islets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 11572-11577.
- [12] D. A. Stoffers, J. Ferrer, W.L. Clarke, J.F. Habener, Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1, *Nat. Genet.* 17 (1997) 138-139.
- [13] C. Minguillon, J. Garcia-Fernandez, Genesis and evolution of the *Evx* and *Mox* genes and the extended *Hox* and *ParaHox* gene clusters, *Genome Biol.* 4 (2003) R12.
- [14] K. Ohneda, R.G. Mirmira, J. Wang, J.D. Johnson, M.S. German, The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 900-911.
- [15] O. Karlsson, M.D. Walker, W.J. Rutter, T. Edlund, Individual protein-binding domains of the insulin gene enhancer positively activate b-cell-specific transcription, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 823-827.
- [16] H. Le Hir, A. Nott, M.J. Moore, How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 215-220.
- [17] A. Nott, H. Le Hir, M.J. Moore, Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex, *Genes Dev.* 18 (2004) 210-222.
- [18] H.V. Petersen, P. Serup, J. Leonard, B.K. Michelsen, O.D. Madsen, Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 10465-10469.
- [19] W.M. Macfarlane, M.L. Read, M. Gilligan, I. Bujalska, K. Docherty, Glucose modulates the binding activity of the b-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner, *Biochem. J.* 303 (1994) 625-631.
- [20] S. Marshak, H. Totary, E. Cerasi, D. Melloul, Purification of the b-cell glucose-sensitive factor that transactivates the insulin gene differentially in normal and transformed islet cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 15057-15062.
- [21] M.S. German, J. Wang, R.B. Chadwick, W.J. Rutter, Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev.* 6 (1992) 2165-2176.
- [22] S.C. Campbell, W.M. Macfarlane, Regulation of the *pdx1* gene promoter in pancreatic b-cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299 (2002) 277-284.
- [23] P. Serup, J. Jensen, F.G. Andersen, M.C. Jorgensen, N. Blume, J.J. Holst, O.D. Madsen, Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 9015-9020.
- [24] H. Watada, Y. Kajimoto, J. Miyagawa, T. Hanafusa, K. Hamaguchi, T. Matsuoka, K. Yamamoto, Y. Matsuzawa, R. Kawamori, Y. Yamasaki, PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in aTC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin, *Diabetes* 45 (1996) 1826-1831.
- [25] K. Gerrish, M.A. Cissell, R. Stein, The role of hepatic nuclear factor 1a and PDX-1 in transcriptional regulation of the *pdx-1* gene, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47775-47784.
- [26] S.K. Chakrabarti, J.C. James, R.G. Mirmira, Quantitative assessment of gene targeting *in vitro* and *in vivo* by the pancreatic transcription factor, Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 13286-13293.

Annex I

1. DISSENY DE CONSTRUCCIONS PER A L'EXPRESSIONI DE PROTEINES A CÈL.LULES DE MAMÍFER

En l'amplificació dels gens ParaHox, per tal de clonar-los en vectors d'expressió, es van utilitzar diferents estratègies segons les dificultats concretes que presentava cada gen. Tots els gens (a excepció de *Cdx1*, que va ser cedit per Peter Gruss) van ser obtinguts per PCR, a partir de DNA genòmic de ratolí. A l'hora de realitzar les construccions, enlloc de clonar-hi el cDNA de cada factor de transcripció ParaHox, i tenint en compte que l'eficiència de transport i producció de proteïna recombinant a cèl.lules eucariotes està íntimament relacionada a la maduració de transcrits, es va decidir incloure, com a mínim, un intró en cada construcció d'expressió, bé un intró propi, bé un intró sintètic afegit al cDNA (le Hir et al. 2003). Aquest requeriment va dificultar la feina d'amplificació, ja que en el moment de començar aquest treball, d'alguns dels gens no existia la seqüència completa i per tant no en coneixiem la mida dels introns (per exemple, en el cas dels gens *Gsh*). Aleshores, vam decidir amplificar per separat els diferents exons i afegir a la construcció, un intró sintètic. Altres vegades, com per exemple per *Cdx1*, la seqüència codificant estava mal anotada en els bancs de dades i es va observar, per comparació de seqüència entre ratolí i humà, que faltaven 443 bp a la regió 5' de l'exó 1. En *Cdx1* i *Cdx4*, on era coneguda la seqüència genòmica completa, es va haver d'amplificar els exons 1 per separat, degut a que les condicions de PCR necessàries per a la seva amplificació eren diferents que per a la resta de gen. Això era degut a un alt contingut de G i C en la seqüència codificant dels primers exons que feia imprescindible la utilització de DMSO -un agent desnaturalitzant que disminueix la probabilitat de formació d'estructures secundàries transitòries en regions riques en G i C- per a la seva amplificació.

Un cop realitzades les construccions en els vectors d'expressió, per tal d'observar l'efecte de la sobreexpressió d'aquests factors de transcripció sobre la regulació del promotor del gen de la insulina, s'amplificà un fragment de 640 bp del promotor i es col.locà davant d'un gen informatiu de quantificació fàcil i molt sensible, com és el gen de la luciferasa. Ha estat descrit en diversos articles, que una regió d'aproximadament 400 bp a 5' del gen de la insulina és necessari i suficient per a la transcripció en cèl.lula β (Petersen et al. 1994); (German et al. 1995). La raó per la qual el nostre fragment amplificat és més gran, és per estratègies de clonatge.

S'utilitzà BluescriptSK com a vector per a la clonació intermèdia de tots els gens abans de clonar-los en el vector d'expressió pcDNA3 (Invitrogen). El vector pGL3-BasicVector, amb el gen *reporter* de la luciferasa, s'usà com a *reporter* per al promotor de la insulina, el pSV- β -GalactosidaseVector (Promega) com a control per a les transfeccions i el pIRESneo (Clontech) per a l'obtenció de l'intró sintètic. Per a la preparació de tots els vectors d'expressió s'utilitzà el *Plasmid Midi Kit* de QIAGEN.

2. CLONATGE DELS cDNAs/DNAs

Com a condicions estàndar els encebadors per a l'amplificació (PCR) s'utilitzaren a una concentració de 0'2 µM, 1'5 µM de MgCl₂ i l'enzim Taq *High Fidelity* (Roche). A continuació es detallen, per a cada gen, la seqüència dels encebadors i l'estratègia específica utilitzada per amplificar i clonar cadascun dels factors de transcripció.

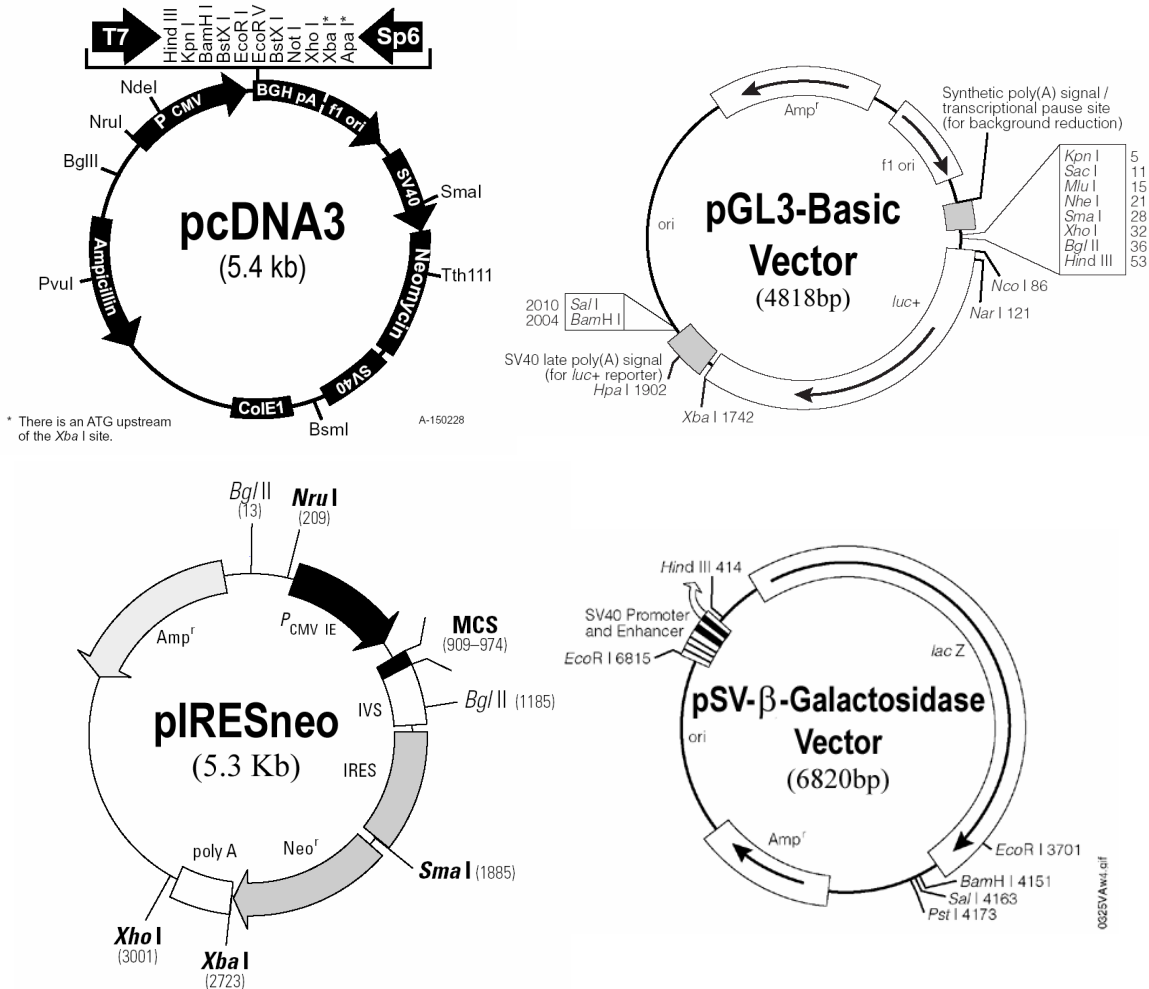


Fig.1 Representació gràfica de tots els vectors originals i modificats utilitzats per a la clonació de les construccions utilitzades per als experiments de transfecció. Imatges obtingudes de les diferents pàgines webs de les cases comercials. PcDNA3 (Invitrogen), pGL3-Basic Vector (Promega), pIRESneo (Clontech) i pSV-β-Galactosidase Vector (Promega).

2.1. Promotor de la insulina

Es va amplificar per PCR un fragment de 646 bp del promotor del gen de la insulina a partir del nucleòtid -1, que contenia tots els elements reguladors descrits per a la transcripció d'aquest gen a cèl.lules β (Petersen et al. 1994). La PCR de dos passos incloïa 20 segons de desnaturalització a 94°C i una temperatura d'hibridació de 68°C durant un minut, durant 35 cicles. Els encebadors utilitzats foren:

InsF: 5' GCTCTAGAAGTGCCTTGCTGCCTGAATTCTG 3' amb una diana *Xba*I.

InsR: 5' GAAGATCTGTTGAAACAATAACCTGGAAGATAG 3' amb una diana *Bgl*II.

El fragment amplificat i digerit amb els dos enzims esmentats, fou clonat en un vector pGL3 digerit per *Nhe*I i *Bgl*II.

2.2. *Pdx1*

Es va amplificar per PCR un fragment de 5'5 Kb a partir de DNA genòmic de ratolí (Clontech), que contenia els dos exons del gen i el corresponent intró. La PCR constava de 10 cicles amb 20 segons de desnaturalització a 94°C, un minut d'hibridació a 64°C i 5 min d'elongació a 72°C; 35 cicles més amb igual temperatura i temps de desnaturalització i 5 min finals d'anellament i alhora elongació a 68°C. Els encebadors utilitzats foren:

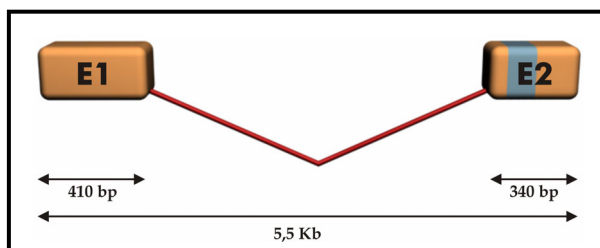


Figura 2. Construcció de *Pdx1*.

bIPF1F: 5' AGTGCCGGCTGCCACCATGAA 3'

bIPF1R: 5' TCACCGGGGTTCTCGCGTTCG 3'

El fragment fou clonat en un pBluescript SK digerit amb *Sma*I i desfosforilat, i fou alliberat d'aquest plasmidi digerint amb *EcoRV/Not*I i clonat en un vector pcDNA3, prèviament digerit amb els mateixos enzims (Fig. 2).

2.3. *Cdx1*

Part de l'exó 1 va ser amplificat a partir de DNA genòmic de ratolí (Clontech), amb una PCR de 35 cicles, amb 30 segons de desnaturalització a 94°C, 30 segons d'anellament a 60°C i un minut d'elongació a 72°C, amb un 5% de DMSO. Els encebadors utilitzats foren:

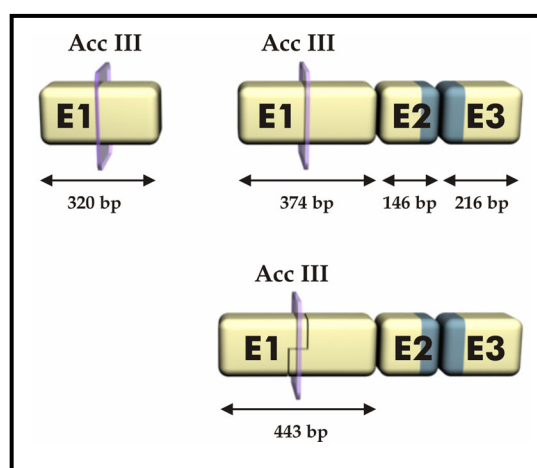


Figura 3. Construcció de *Cdx1*

443X1F: 5' CCCAAGCTTATGTACGTGGGCTATGTGCTGG 3' (*Hind*III)

2onCDX1R: 5' CGCTGCCACCGCCGCTG 3'

L'exó 2 i l'exó 3 van ser amplificats amb una PCR de 40 cicles que constava de 20 segons de desnaturalització a 94°C i un minut d'anellament i elongació a 65°C, a partir d'un plàsmid que contenia l'exó 2 i 3 (cedit per Peter Gruss). Els encebadors utilitzats van ser:

I2X1F: 5' GTAAGACCCGAACCAAGGACAA 3'

I2X1R: 5' GCGGATCCCTAGGGTAGAACTCCTCCTTG 3' (*Bam*HI).

Els dos fragments van ser digerits per una diana comuna *Acc*III, lligats i clonats en un plasmidi prèviament digerit *Hind*III /*Bam*HI (Fig. 3). Finalment s'afegí un intró sintètic retallat de pRESneo i lligat a l'extrem 3' del gen.

2.4. *Cdx2/3*

Totes les amplificacions es van fer a partir de DNA genòmic de ratolí (Clontech). L'exó 1, més part de l'intró 1 corresponent a un fragment de 2830 bp, va ser amplificat amb una PCR de 35 cicles, amb 30 segons de desnaturalització a 94°C, 30 segons d'anellament a 60°C i 3 minuts d'elongació a 72°C. A la PCR s'afegí un 5% de DMSO. Aquest exó va haver de ser amplificat per separat, perquè era molt ric en G i C i no era possible amplificar-lo a les mateixes condicions que la resta del gen. Els encebadors utilitzats van ser:

CDX2F: 5' CCCAAGCTTATGTACGTGAGCTACCTTCTGG 3' (*Hind*III)

RCDX2Bg: 5' AGTGCCTAGTTGAACAAGGAG 3'

L'exó 2 -intró 2 -exó 3 restants, corresponents a un fragment de 3192 bp, van ser amplificats en una PCR de dos passos i 40 cicles, amb una temperatura de desnaturalització de 94°C durant 30 segons i una temperatura d'anellament i elongació de 68°C durant 3 minuts. Els encebadors utilitzats van ser:

FCDX2Bg: 5' CGGGGCCTTAAACCCTGG 3'

bCDX2R: 5' ACGCGTCGACAGACCACGGGAGGGGTCCTG 3' (*Sall*)

Els dos fragments amplificats tenen una diana *Bgl*II única per a tot el gen, de manera que les dues bandes es digeriren amb *Bgl*II i l'enzim corresponent (*Hind*III o *Bam*HI) i així es van lligar en el vector pcDNA3, digerit amb els mateixos enzims (Fig. 4).

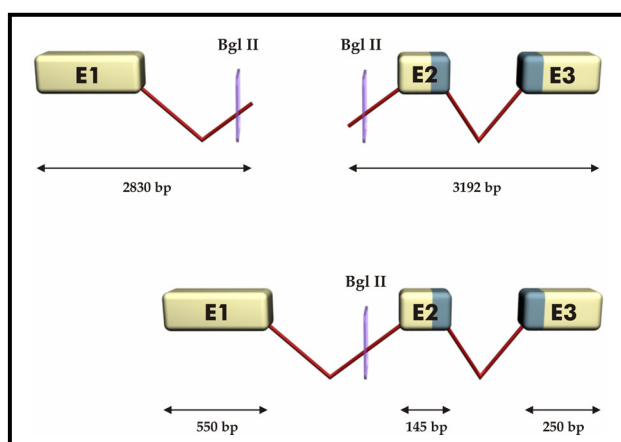


Figura 4. Construcció de *Cdx2/3*.

2.5. *Cdx4*

S'amplificà per PCR un fragment de 500 bp corresponent a l'exó 1. En aquest cas, igual que per *Cdx2/3*, l'exó 1 va haver de ser amplificat per separat, perquè era molt ric en G i C i no era possible amplificar-lo a les mateixes condicions que la resta del gen. La PCR constava de 10 cicles inicials amb una temperatura de desnaturalització de 94°C durant 20 segons, 1 minut d'hibridació a 62°C i 20 segons més d'elongació a 72°C, seguidament 30 cicles més amb la mateixa temperatura i temps de desnaturalització i 1 minut d'hibridació a 68°C. Els encebadors utilitzats foren:

CDX4F: 5' CCCAAGCTTATGTATGGAAGCTGCCTTTTAGAAA 3' (*HindIII*)

CDX4R: 5' CATGCATGCCGTCCGTCCACCTGCACAGTTTTGC 3' (*SphI*)

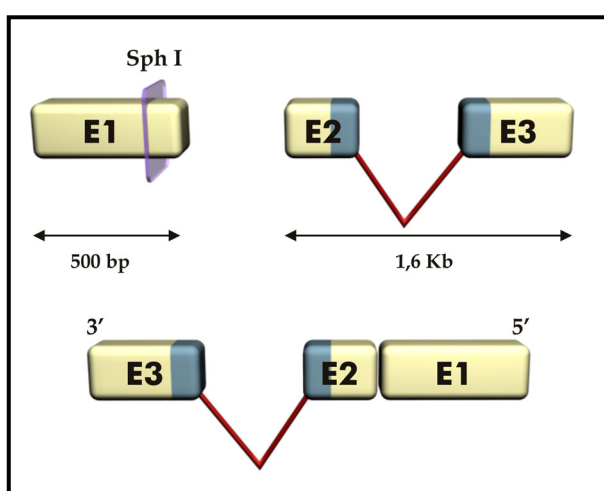


Figura 5. Construcció de *Cdx4*

Aquest fragment fou clonat 3'-5' en un vector BluescriptSK digerit amb *SmaI* i desfosforilat. Posteriorment, aquest plasmidi es va digerir amb *SphI*, fet rom amb la tècnica *cut back* i digerit amb *EcoRI*, i es procedí a lligar-lo amb el fragment que contenia un tros l'exó 1, l'intró 2, i l'exó 2, previament digerit amb *EcoRI*. S'amplificà per PCR el fragment de 1'6 Kb que contenia l'exó 2, l'intró 2 i l'exó3, clonat independentment. La PCR de 45 cicles constava de 20 segons de desnaturalització a 94°C, 30 segons d'hibridació a 62°C i 2

minuts d'elongació a 72°C. Els encebadors foren:

I2X4F: 5' GGAAAACCAGGACAAAAGAAAAGTA 3'

I2X4R: 5' CGGAATTCATTCAGAAACTATGACCTGCT 3' (*EcoRI*)

Un cop es va obtenir el fragment sencer, es va alliberar del vector Bluescript digerint per *HindIII/EcoRI* i es va clonar en el vector pcDNA3 (Fig. 5).

2.6. *Gsh1*

Tan *Gsh1* com *Gsh2* van ser amplificats a partir de DNA genòmic, però els dos exons van haver de ser amplificats per separat perquè no disposavem de la seqüència intrònica. L'exó1 de *Gsh1* corresponent a un fragment de 411 bp va ser amplificat en una PCR de 35 cicles, amb una temperatura de desnaturalització de 94 °C durant 30 segons, 30 segons més d'hibridació a 55°C i

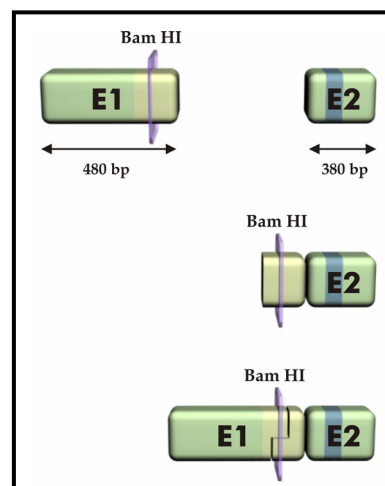


Figura 6. Construcció de *Gsh1*.

finalment, 30 segons d'elongació a 72°C. Els encebadors utilitzats foren:

bGSH1F: 5' CCCA**AAGCTT**AGCCATGCCGCGCTCCTTCC 3'

2E1H1R: 5' GCAGTGAAACTGTCTGGGATCC 3'

L'exó 2 corresponent a un fragment de 350 bp va ser amplificat amb una PCR de 45 cicles, amb una temperatura de desnaturalització de 94°C durant 30 segons, 30 segons més d'hibridació a 55°C i 30 segons d'elongació a 72°C. Els encebadors utilitzats foren:

SolH1F: 5' TGCATCTCTGTGGACAGCAGCTCGAAC 3'

EcoH1R: 5' CGGA**ATTC**AAGGCGCACCTACGGAGTGAC 3' (*HindIII*)

Un cop es va tenir aquest fragment clonat en un plasmidi BluescriptSK digerit amb *SmaI* desfosforilat, es va fer una altra PCR per allargar aquest fragment per l'extrem 5' fins arribar a una diana *BamHI* que es troba en l'exó1. La PCR fou exactament la mateixa que l'anterior amb l'encebador:

newH1F: 5' CCG**GATCC**CAGACAGTTTCACTGCATCTCTGTGGACAGCAGCTCG 3'

(*BamHI*). El fragment de l'exó 1 es va digerir amb *HindIII/BamHI* i el fragment de l'exó 2 amb *BamHI/EcoRI* i això es va lligar juntament amb vector pcDNA3.1 digerit *HindIII/EcoRI*. Finalment s'afegí un intró sintètic retallat del pIRESneo (*Nsil*, *cut back*, *EcoRI*) i lligat a l'extrem 3' del gen (Fig. 6).

2.7.Gsh2

L'exó 1 corresponent a un fragment de 580 bp va ser amplificat amb una PCR de 35 cicles, amb una temperatura de desnaturalització de 94°C i 30 segons, 30 segons d'anellament a 65°C i un minut d'elongació a 72°C. Per fer la PCR es va afegir un 5% de DMSO, ja que aquest exó era molt ric en C i G. Els encebadors utilitzats van ser:

bGSH2F: 5' CCCG**AAGCTT**CAAGCCATCCATCGACATGTC 3' (*HindIII*)

2E1G2R: 5' CCCATGGAGAGGCAGTGGAAATC 3'

L'exó 2 de *Gsh2* corresponent a un fragment de 320 bp va ser amplificat amb una PCR de dos passos i 35 cicles, amb una temperatura de desnaturalització de 94°C durant 30 segons i una temperatura d'anellament i elongació de 68°C durant 2 minuts. Els encebadors utilitzats van ser:

FGSH2in: 5' AGGCTCCGATACCAGCCAGGT 3'

bGSH2R: 5' CG**GATCC**AGGAGCCTCTGCCTTTACAAG 3' (*BamHI*)

Un últim pas permet la reconstitució dels dos exons i clonar-los en el vector d'expressió pcDNA3 digerit *HindIII/BamHI* i seguidament afegir-hi un intró sintètic retallat del pIRESneo amb els enzims *BamHI/ApaI*, clonat al 3' del gen (Fig. 7).

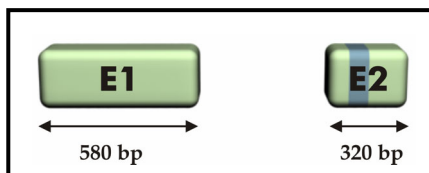


Figura 7. Construcció de *Gsh2*.

Discussió general

Discussió general

1.HOX I PARAHOX

El gen *IPF1* forma part del complex gènic de gens amb *homeobox* denominat complex ParaHox, format pels gens de la família *Gsh*, *IPF* i *Cdx*. L'organització en complexs gènics pot ser degut a l'existència de mecanismes de regulació general de tot el complex, que fan que els gens que l'integren hagin d'estar físicament adjacents en el cromosoma. L'exemple més clar el mostren els complexs gènics Hox (quatre complexs en mamífers), on existeixen mecanismes de regulació compartits entre els diferents gens Hox (Duboule 1998). Com s'esmenta en la introducció, un altre fenomen que pot forçar la disposició en *cluster* és la colinearitat temporal, que fa referència a l'expressió ordenada en el temps dels membres del complex (els gens del complex Hox, situats a més 3', s'expressen en territoris més anteriors de l'embrió i ho fan abans en el desenvolupament que els gens situats a més 5') (Wada et al. 1999). Per tant, aquest manteniment de l'agrupació dels gens és necessari per a la seva correcta expressió.

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor Photo - JPEG.

Figura 1. Fotografia del cefalocordat amfiox: a sobre, la femella i a sota, el mascle. Extret (Minguillón et al. 2002)

La disposició en *cluster* del complex ParaHox va ser descrita inicialment en el cefalocordat amfiox (Brooke et al. 1998). L'amfiox pertany al *Phylum* dels *Chordata*, que comprèn els *Subphyla* dels *Urochordata* (Tunicata), *Cephalochordata* (amfiox) i el dels *Vertebrata*. Els adults mostren moltes qualitats intermèdies entre les d'invertebrats i de vertebrats, per això s'ha dit d'ells que podrien representar el descendent viu més similar a l'ancestre dels vertebrats. La visió actual, àmpliament acceptada, sobre la seva localització filogenètica classifica els cefalocordats com a grup germà dels vertebrats (Cameron et al. 2000). Aquesta posició situa la divergència de l'amfiox just abans dels dos fenòmens de duplicacions genòmiques que es creu que van tenir lloc a la base de l'evolució dels vertebrats (Furlong and Holland 2002). El que està clar és que per a la majoria de famílies gèniques, trobem més representants en el genoma dels vertebrats que en el genoma de l'amfiox. Així doncs, s'ha anomenat el genoma de l'amfiox com a arquetípic (semblant, però més senzill, almenys pel que fa referència al nombre de gens) en comparació al dels vertebrats (Garcia-Fernández and Holland 1994). Per aquesta raó, les sondes que es van utilitzar per als crivellatges a la genoteca de cDNA de pàncrees, van ser inicialment obtingudes de la regió de l'*homeobox* del gen *Xlox* de l'amfiox, proortòleg de tots els putatius gens *Pdx* de vertebrats.

L'anàlisi dels complexos Hox en l'amfiox fou central per a la hipòtesi, acceptada avui en dia, que els vertebrats es van originar gràcies a dues fases de duplicacions genòmiques a gran escala. Si tenim en compte que el complex ParaHox és el paràleg evolutiu del complex Hox, és lògic pensar que el gen *Xlox* d'amfiox és molt similar a l'ancestre del gen *IPF1 (Pdx)* humà i que, per tant, els possibles *Pdx* duplicats serien més semblants a l'ancestre d'amfiox que no entre ells, ja que durant l'evolució, haurien seguit camins evolutius diferents en anar acumulant mutacions diferencialment.

Moltes regions del genoma estan "repetides", amb gran nombre de gens duplicats, i són parcialment redundants en la seva funció. Es va analitzar la localització cromosòmica de tots els gens ParaHox descrits en el genoma humà i de ratolí i es va hipotetitzar que havien existit inicialment fins a quatre complexos ParaHox en el genoma de vertebrats i que cap d'ells havia estat caracteritzat en la seva totalitat. La sintènia en aquestes regions, tant en ratolí com en l'home, s'extén com a mínim a diversos altres gens (receptors tirosina cinasa, factors d'iniciació de la transcripció, proteïnes ribosomals, gens de la col.làgena, proteïnes de *gap-junction*, etc...). Així les duplicacions que haurien donat lloc a aquestes regions sintèniques haurien inclòs tot el complex ParaHox (i, per tant, al gen *Pdx1*), que s'hauria duplicat fins a originar fins a quatre complexos ParaHox, i consegüentment, fins a quatre putatius gens del tipus *Pdx*.

No està massa clar com dues o més còpies d'un gen duplicat poden passar d'un estat en què són totalment redundants (per tant les còpies poden ser prescindibles o fins i tot deletèries degut a l'excés de dosi gènica), a una situació estable en què les dues còpies es mantenen per selecció natural. S'han proposat quatre vies alternatives després d'un fenomen de duplicació (Lynch and Conery 2000):

i) la no-funcionalització, on una de les còpies es silencia per mutacions degeneratives (de manca de funció).

ii) la neofuncionalització, on una de les còpies adquireix una nova funció (que serà mantinguda per selecció natural) i l'altra manté la funció original.

iii) la subfuncionalització, on ambdues còpies acumulen mutacions degeneratives a les regions reguladores que fan que només la suma de les funcions d'ambdues sigui igual a la funció original i, per tant, es fa necessari el manteniment d'ambdues còpies al genoma. Aquesta hipòtesi és coneguda com a DDC (duplicació-degeneració-complementació).

iv) també és possible una combinació entre el segon i el tercer mecanisme. Si tenim en compte les funcions que realitzen els diferents gens del complex ParaHox en els vertebrats, sembla possible que el manteniment dels gens duplicats pugui ser degut a una combinació de neofuncionalització i subfuncionalització.

És conegut que en vertebrats, com ara humans i ratolí, la majoria de membres d'una determinada família gènica originada pels processos de duplicació tenen funcions molt similars o, com a mínim, parcialment solapades. Aquesta redundància és encara més evident als gens

Hox, donat que es troben en complexos gènics on l'expressió dels gens és coordinada. Els nous gens Pdx haurien format part del complex ParaHox, presumptament amb expressió també coordinada dels seus membres i, per tant, probablement haurien tingut un patró d'expressió i una funció similar al gen *Pdx1*. De fet en el cas dels gens ParaHox també són observables algunes funcions redundants entre membres de la mateixa família gènica:

Els gens *Cdx* s'expressen a la regió més caudal de l'embrió. Fins al moment de la realització d'aquest treball, es creia que *Cdx4* s'expressava només durant el desenvolupament embrionari (Gamer and Wright 1993); *Cdx1* i *Cdx2* s'expressen durant el desenvolupament embrionari especificant l'eix antero-posterior de l'embrió (revisat a (Lohnes 2003)) i en el desenvolupament de l'intestí (Silberg et al. 1997). En l'adult també tenen regions d'expressió i funcions parcialment solapades (Chawengsaksophak et al. 1997). Tots dos estan implicats en la diferenciació i proliferació de l'intestí i en el manteniment del seu estat diferenciat (*Cdx1* activant la proliferació i *Cdx2* inhibint *Cdx1* i, per tant, la proliferació), (Lorentz et al. 1997). Pel que fa als gens *Gsh*, aquests s'expressen durant el desenvolupament del sistema nerviós central: *Gsh1* amb funcions a la glàndula pituitària (Li et al. 1996) i *Gsh2* en l'especificació del bulb olfatori (Hsieh-Li et al. 1995). L'observació d'aquestes funcions parcialment redundants en gens de la mateixa família va ser una altra de les raons que van portar a hipotetitzar que, si el gen *Pdx* s'havia duplicat, les seves còpies podien haver mantingut funcions parcialment redundants i que, per tant, possiblement els gens duplicats poguessin estar implicats en la regulació del gen de la insulina o en el manteniment de l'homeostasi de la glucosa en l'organisme i/o en el desenvolupament del pàncrees.

Aquestes regions d'expressió del *cluster* ParaHox també feien pensar en el manteniment d'una certa colinearitat espacial, en la necessitat de mantenir el *cluster* i, així, en la possible existència de nous gens Pdx en el genoma. Aquesta afirmació podria ser posada en dubte si tenim en compte que, tot i que *Cdx* i *Pdx* s'expressen en regions endodèrmiques, els dos gens *Gsh* s'expressen en regions ectodèrmiques, tot i que darrerament, ha estat proposat que l'expressió ectodèrmica de *Gsh* sigui derivada i que, originàriament, s'expressés en regions anteriors de l'endoderm mantenint, així, la colinearitat espacial (Ferrier and Holland 2001); (Ferrier and Holland 2002).

2.A LA CERCA D'IPF2

Una altra dada que es va tenir en compte a l'hora de formular la hipòtesi de treball és que el pàncrees endocrí és una innovació evolutiva dels vertebrats, ja que els invertebrats no tenen pàncrees diferenciat, però sí que presenten cèl.lules secretores d'hormones en l'epiteli intestinal. L'amfiox poseeix un únic gen *Pdx*, i un únic gen de la insulina (*ILP*, *Insulin-like-peptide*). El gen *Pdx* de l'amfiox es transcriu en l'epiteli intestinal durant el desenvolupament embrionari, en el mateix territori en el que es transcriu el gen *ILP*. Ambdós gens es mantenen actius en el mateix territori en l'adult. Això suggereix que *Pdx* activa *ILP*. Per tant, la capacitat

d'activació de *Pdx* sobre el gen de la insulina és una característica antiga, anterior a les duplicacions gèniques dels vertebrats (Holland P et al. 1997). Això apuntava de nou a que els possibles nous gens *Pdx* resultants dels processos de duplicació serien capaços d'activar el gen de la insulina o els IGF (Peshavaria et al. 1997), donat que les caixes homeòtiques (responsables de l'especificitat d'unió al DNA) dels gens duplicats han de ser molt similars (tal i com passa amb els altres gens *ParaHox* i *Hox*).

El gen *Pdx1*, a part de ser el factor de transcripció clau en la regulació del gen de la insulina, també és un factor determinant en el desenvolupament del pàncrees (Jonsson et al. 1994). En el ratolí mutant per *Pdx1* no es desenvolupa el pàncrees, tot i que es formen els primordis pancreàtics. Després, el desenvolupament queda aturat en aquest estadi (Ahlgren et al. 1996). Així doncs, sembla que *Pdx1* realitza dues funcions claus. Una, en l'inici del desenvolupament del pàncrees, on existeix un pic d'expressió en E8, moment en què *Pdx1* s'expressa en l'epiteli pancreàtic que formarà el pàncrees. Després el gen es veu regulat a la baixa i, durant la transició secundària, s'expressa a les cèl.lules β pancreàtiques, regulant el gen de la insulina (Ohlsson et al. 1993); (Sander et al. 1997). El ratolí mutant condicional per aquest gen desenvolupa diabetis en no poder activar el gen de la insulina. Vist aquest doble requeriment de *Pdx1*, i tenint en compte totes les dades, tant evolutives com moleculars que s'han anat esmentant, es va inferir que tal vegada el gen *Pdx1* havia adquirit la funció de factor morfogenètic en el desenvolupament del pàncrees, i d'aquí el fenotip del ratolí *knock-out*, mentre que la resta hauria mantingut la seva capacitat activadora del gen de la insulina, ja present en el seu predecessor.

En conjunt, amb totes aquestes dades que suggerien l'existència de putatius nous gens *Pdx*, es va començar la seva cerca utilitzant, principalment i en paral.lel, les dues tècniques explicades en l'apartat de materials i mètodes: PCR amb oligonucleòtids degenerats i triatges sobre una genoteca de cDNA de pàncrees humà, mentre, al mateix temps, també s'anaven realitzant cerques per homologia de seqüència en el *Human Genome Working Draft Sequence*, que s'anava completant a mesura que avançava la cerca. Tal com es descriu detalladament en els resultats, cap de les vies emprades va tenir èxit i, finalment la publicació del genoma humà va confirmar, malauradament, la no existència de gens duplicats de *Pdx1* funcionals al genoma.

Així doncs, s'infereix, que els possibles gens *Pdx* resultants de les grans duplicacions a la base dels vertebrats, no van seguir els camins de neofuncionalització i/o subfuncionalització que s'havien hipotetitzat, sinó que, segurament, van esdevenir còpies silenciades o pseudogens que anaren acumulant mutacions inactivants o delecions al llarg de l'evolució, fins que la seva seqüència final va ser absolutament degenerada i no reconeixible per homologia de seqüència.

Es pot concloure que tot i que la hipòtesi de treball es cimentava sobre unes bases sòlides recolzades tant per les evidències moleculars com evolutives que s'han anat detallant, i que la metodologia de treball va ser l'adequada, la hipòtesi sobre l'existència d'altres gens *Pdx* funcionals en el genoma va resultar ser negativa i amb la publicació de la seqüència del genoma es pot assegurar que no existeixen altres gens *Pdx* actius en el genoma humà. Així doncs, la

història evolutiva de les regions que inclouen els gens ParaHox, han quedat definitivament establertes tal com es descriu en la Figura 2.

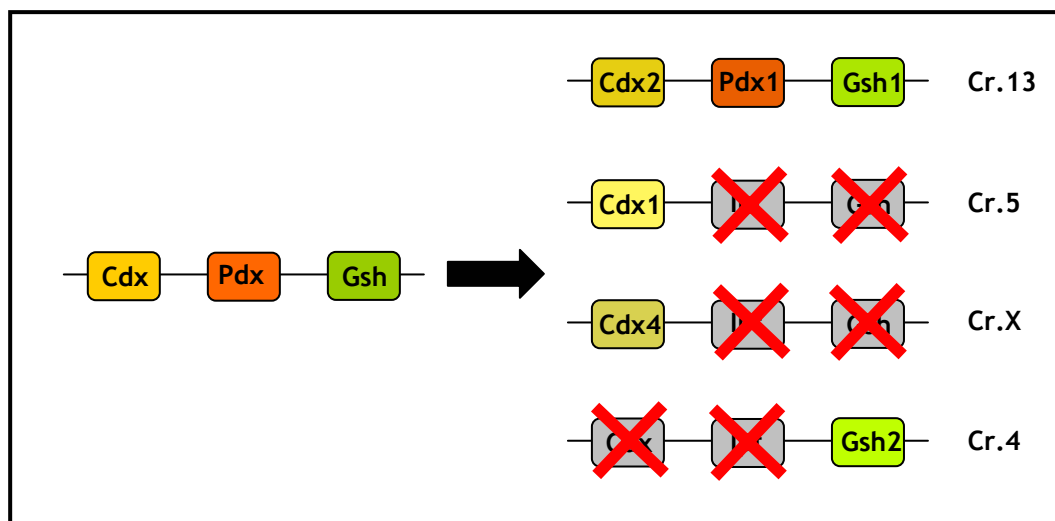


Figura 2. Evolució i duplicacions del complex ParaHox ancestral, fins als diferents gens ParaHox que es troben avui en dia en el genoma humà. Els gens amb una creu són els que s'haurien perdut o haurien degenerat durant l'evolució.

3. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DELS GENS PARAHOX

Com ja quedà palès en les dades aportades en la introducció, la majoria de recerca prèvia en l'estudi de l'expressió i funció dels gens ParaHox havia estat realitzada a nivell de desenvolupament embrionari (excepte en el cas del gen *Pdx1*, a causa de la seva implicació en la regulació del gen de la insulina) (Ohlsson et al. 1993). Les dades que es tenien de la seva possible expressió i funció en teixits adults quedaven limitades a estudis sobre *Cdx1* i *Cdx2/3* en intestí, degut a la seva implicació en processos tumorigènics i en el manteniment de l'estat diferenciat i la contínua renovació epitelial, característica d'aquest teixit (Lorentz et al. 1997) i a estudis sobre *Pdx1* i la seva funció en les cèl.lules β pancreàtiques (Guz et al. 1995). En aquest context, es va creure interessant estudiar l'expressió dels gens ParaHox en altres teixits adults.

És ben conegut que els factors de transcripció involucrats en processos de desenvolupament, poden ser reclutats per mantenir o regular l'estat diferenciat de les cèl.lules en l'adult (James et al. 1994). Un clar exemple en són els gens ParaHox acabats d'esmentar. Aquests gens tenen dues fases d'expressió marcades: una durant el desenvolupament embrionari i l'altre, ja en l'adult. Cal remarcar, que tot i que l'expressió dels gens amb *homeobox* es veu molt reduïda cap al final de la vida fetal, alguns d'aquests gens continuen actius durant els estadis adults en òrgans que tenen renovació o remodelament cel.lular com l'intestí, la pell o el fetge (James and Kazenwadel 1991); (Freund et al. 1998).

3.1. Expressió dels ParaHox durant el desenvolupament

Sobre un panell de cDNA que representava diferents estadis del desenvolupament embrionari del ratolí (E7, E11, E15 i E17) es van realitzar RT-PCRs per tal d'analitzar l'expressió dels gens ParaHox.

L'expressió de *Pdx1* es detecta a E11, però no a E7, d'acord amb els articles previs on es descriu l'inici de l'expressió de *Pdx1* en E8.5, quan comencen a formar-se els primordis pancreàtics (Jonsson et al. 1994). L'expressió de *Cdx1* es detecta només en els estadis més tardans de desenvolupament on, com a mínim, estaria implicat en la diferenciació de l'intestí (Silberg et al. 1997). L'expressió de *Cdx4*, en canvi, es detecta en els estadis inicials del desenvolupament i va disminuint a mesura que aquest avança, d'acord amb la seva funció en estadis temprans del desenvolupament embrionari (revisat a (Lohnes 2003)). L'expressió de *Cdx2/3* es detecta a nivells elevats en tots els estadis analitzats. És conegut que aquest gen té un paper determinant en l'especificació de l'eix A-P i en la diferenciació de l'epiteli intestinal (Chawengsaksophak 1997). Els dos gens *Gsh* tenen un patró d'expressió idèntic que comença a ser detectat en E11; tots dos gens intervenen en el desenvolupament de diferents àrees del sistema nerviós central (Li et al. 1996); (Hsieh-Li et al. 1995).

Així, tots els gens ParaHox s'expressen durant el desenvolupament embrionari, on realitzen funcions ja conegudes i on poden estar formant part de complexes xarxes gèniques que intervenen en l'especificació de territoris o llinatges cel·lulars.

3.2. Expressió dels gens ParaHox en teixits adults

3.2.1. RT-PCRs

Com s'observa en el capítol II, tots els gens ParaHox s'expressen en diversos teixits adults. Alguns d'ells, fins i tot, s'expressen de forma quasi ubicua (encara que a nivells baixos) en tots els teixits analitzats, com és el cas del gen *Cdx4*, mentre que d'altres, com *Gsh1* i *Gsh2*, ho fan de forma més restringida. Així, els gens del complex ParaHox, a part de les seves funcions durant el desenvolupament, tindrien papers encara no coneguts, de manteniment o regulació en teixits adults. Per exemple, l'expressió del gen *Cdx4*, que només havia estat descrita durant el desenvolupament (Gamer and Wright 1993), també es dona a diferents nivells en molts teixits adults, particularment al ronyó on podria estar regulant algun procés metabòlic complex del teixit renal. *Cdx1* es detecta a pulmó i a múscle, mentre que *Cdx2/3* a fetge i testicles. De fet, sembla ser que molts gens ParaHox s'expressen a testicle i, a nivells molt baixos, a cervell. Tot i que l'expressió a testicle pot semblar poc rellevant a nivell fisiològic, ja que molts gens s'expressen a nivells basals a cèl·lules germinals, l'expressió a cervell pot ser força interessant si es demostrés que és específica de certs tipus cel·lulars o regions concretes.

Finalment, el que es pot inferir d'aquestes dades és que els gens ParaHox poden estar duent a terme moltes funcions en teixits adults, que encara necessiten ser descrites i que poden

formar part de complexes xarxes gèniques que regulin la diferenciació o/i el manteniment de l'estat diferenciat en determinats òrgans de l'adult.

3.2.2. Hibridacions *in situ*

Després d'analitzar i l'expressió dels gens ParaHox en diferents teixits adults i tenint en compte que el nostre grup estava inicialment centrat en la cerca de gens amb *homeobox (IPF/PDX)* que poguessin estar implicats en la regulació del gen de la insulina, es va creure interessant estudiar l'expressió dels gens ParaHox en el pàncrees del ratolí adult. Com s'ha anat repetint, tant *Pdx1* com *Cdx2/3* tenen un clar paper en la regulació de l'homeostasi de la glucosa, ja sigui regulant el gen de la insulina en el cas de *Pdx1*, o regulant el gen del glucagó en el cas de *Cdx2/3* (Jin and Drucker 1996). Tots els gens ParaHox actuen com a factors de transcripció, unint-se al promotor dels gens que regulen a través del seu homeodomini. Ja ha estat descrit anteriorment, que altres gens amb *homeobox*, com *Lmx1* (Karlsson et al. 1990), poden substituir la funció de *Pdx1* en la transactivació del promotor del gen de la insulina.

Així doncs es va hipotetitzar que altres gens ParaHox, l'expressió dels quals encara no havia estat descrita en pàncrees, podien estar-se expressant en aquest òrgan i duent a terme funcions implicades en la diferenciació cel.lular o en el seu manteniment. En aquest context, es va decidir utilitzar les tècniques d'hibridació *in situ*, per estudiar l'expressió dels gens ParaHox en pàncrees adult i, així, es va poder confirmar l'expressió de tots ells en el pàncrees endocrí del ratolí adult.

La hibridació *in situ* del gen *Pdx1* es va utilitzar com a control positiu. La seva expressió ha estat àmpliament descrita en pàncrees, com a factor crucial durant el desenvolupament i més tard, en l'adult, en el manteniment de l'estat diferenciat de les cèl.lules β -pancreàtiques endocrines i en la regulació de diferents gens en aquestes cèl.lules (Edlund 2001). Tal com era d'esperar, la seva expressió va ser confirmada en el pàncrees endocrí.

Aleshores, es va procedir a la hibridació *in situ* sobre talls de pàncrees de ratolí adult per detectar l'expressió de la resta de gens del complex ParaHox. Sorprenentment, tots els gens ParaHox van donar senyal positiva en les cèl.lules del pàncrees endocrí.

3.2.3. Immunodetecció

Un cop detectada l'expressió de tots els gens ParaHox en el pàncrees endocrí, es va continuar el treball analitzant en quin tipus cel.lular endocrí s'expressaven. Ja que l'interès en la seva expressió en pàncrees se centrava principalment en la seva possible implicació en la regulació de l'homeostasi de la glucosa, es va decidir realitzar una doble immunodetecció -amb els anticossos anti-insulina (corresponent a cèl.lula β) i anti-glucagó (corresponent a cèl.lula α)- sobre les hibridacions *in situ* comentades en l'apartat anterior.

En aquest punt, s'ha de comentar la novetat de combinar aquestes dues tècniques, doncs la majoria d'estudis realitzats en pàncrees es basen en una de sola i es tenen poques dades que tinguin en compte tan l'mRNA com la proteïna; el seu anàlisi conjunt pot aportar informacions

complementàries i igualment valuoses, per tal d'entendre el funcionament i la regulació d'un determinat gen.

La majoria de gens ParaHox s'expressen en cèl.lules α

Es realitzaren les dobles immunodeteccions (glucagó+insulina) sobre les hibridacions *in situ* de tots els gens ParaHox i s'observà (excepte en el cas de *Pdx1*, que es comentarà més tard) que tots ells s'expressaven en cèl.lules α , ja que el marcatge de la hibridació *in situ* coincidia amb la immunodetecció del glucagó.

És conegut que *Cdx2/3* en les cèl.lules α regula la transcripció del gen del glucagó unint-se al seu promotor (Jin and Drucker 1996). No obstant, encara queda per determinar si els altres gens *Cdx* i *Gsh* poden estar directament involucrats en la regulació de la transcripció del gen del glucagó, o participen en l'homeostasi glucagó-insulina, o si regulen altres gens no relacionats amb la producció d'hormones, com per exemple en el manteniment de l'estat diferenciat.

Recentment, una publicació sobre el requeriment dels factors de transcripció HNF en la diferenciació dels hepatòcits i les cèl.lules dels illots pancreàtics, describia una complexa xarxa gènica d'interaccions, entre els factors de transcripció que activen i regulen la majoria de gens necessaris pel manteniment de l'estat diferenciat (Odom et al. 2004); (Kulkarni and Kahn 2004). La majoria dels gens diana van sent identificats, però encara queden molts factors de la xarxa gènica, que actuen a diferents nivells dels *loops* de regulació i que encara no es coneixen. Per tant, en aquest treball s'hipotetitza el paper dels gens ParaHox com a components importants d'aquestes xarxes gèniques, encara que poguessin no trobar-se en una posició similar a la de *Pdx1* en les cèl.lules β .

Tot i que en els últims anys s'ha avançat molt en la identificació dels components de la regulació transcripcional del pàncrees, molts d'ells han estat identificats casualment en estudis de mutants nuls o *knockouts* i es veia que afectaven al pàncrees. Això ha fet, que de molts d'ells, només se'n conegui una funció determinada de les múltiples que pot arribar a realitzar, degut a que la informació que s'obté d'aquests mutants nuls pot estar emmascarant la resta de possibles funcions que pugui tenir el factor. S'ha de tenir en compte que molts d'aquests factors de transcripció implicats en la regulació del pàncrees actuen en diferents estadis (p.ex. en una onada durant la transició primària i, després, reapareixen durant la transició secundària, com seria el cas de *Pdx1*).

El que sembla evident és que les xarxes gèniques que regulen el desenvolupament pancreàtic, especifiquen els diferents llinatges cel.lulars tant endocrins com exocrins. A més, els processos que modulen l'activitat gènica dels factors de transcripció pancreàtics són xarxes molt complexes on els mateixos components poden actuar a diferents nivells dels *loops* reguladors, en diferents estadis i/o combinats amb d'altres factors, per tal de realitzar funcions diferents depenent del temps i de l'estadi. Els gens ParaHox, tant per la seva condició de factors de transcripció, com per la seva expressió -descrita en aquest treball- en les cèl.lules α dels illots pancreàtics, són candidats a tenir en compte dintre d'aquestes xarxes gèniques. Un estudi de les

seves funcions o possibles interaccions seria interessant per tal d'aprofundir en el coneixement del funcionament pancreàtic i en la regulació de l'homeostasi de la glucosa en l'organisme.

Expressió de *Pdx1* en el pàncrees endocrí

A) *Pdx1*+GLUCAGÓ+INSULINA

Era d'esperar que *Pdx1*, com a factor de transcripció que regula el gen de la insulina, tingués una expressió elevada en les cèl.lules β endocrines que es troben en el nucli dels illots pancreàtics en el ratolí. El patró d'expressió que es va obtenir al realitzar la hibridació *in situ* amb aquest gen va ser, en certa manera, sorprenent. Malgrat que es detectava marcatge en el citoplasma de les cèl.lules del nucli de l'illot, aquest era més dèbil que el que s'observava en algunes cèl.lules localitzades a la perifèria. Al realitzar la doble immunodetecció amb els anticossos anti-insulina i anti-glucagó, el patró fluorescent coincidia amb l'àmpliament descrit en la literatura: un nucli de cèl.lules β productores d'insulina i a la perifèria, les cèl.lules α productores de glucagó (Bramblett et al. 2000).

Degut a aquests resultats, es va decidir repetir l'hibridació *in situ* de *Pdx1* amb dues sondes que cobrien regions diferents del gen, per tal de confirmar que les observacions no fossin degudes a algun error de metodologia. Aquests resultats es repetiren amb les dues noves sondes. A partir d'aquí, es van fer cerques bibliogràfiques per tal de veure si aquests resultats ja havien estat observats anteriorment i, efectivament, alguns grups ja havien observat aquesta diferència entre la localització de l'mRNA de *Pdx1* i la seva proteïna (Stoffers et al. 1999), (Miller et al. 1994), (Sharma et al. 1999). A més, s'ha de dir que la majoria d'estudis fets sobre PDX1 han estat realitzats a nivell de proteïna i que existeixen poques dades sobre l'expressió del seu mRNA. Aquests resultats es discutiran posteriorment, de forma més detallada.

Un altre resultat tampoc esperat que es discuteix també més endavant, va ser el fet que en algunes cèl.lules de la perifèria, l'expressió de *Pdx1* coincidia amb la producció de glucagó.

B) *Pdx1*+PDX1+INSULINA

Per tal d'incidir més detalladament en la localització del mRNA i la proteïna de PDX1, es va realitzar una doble immunodetecció amb els anticossos anti-PDX1 i anti-insulina sobre una hibridació *in situ* amb *Pdx1*. La insulina era detectada en el citoplasma del que serien les cèl.lules β mentre que PDX1 es trobava principalment en el nucli d'aquestes. Pel que fa a l'expressió de *Pdx1*, es continuaven descobrint diferències respecte a la localització de la seva proteïna ja que l'mRNA i la proteïna de PDX1 coincidien, però aquest no sempre colocalitzava amb la insulina.

És conegut que *Pdx1* s'expressa en les cèl.lules δ dels illots, on regula el gen de la somatostatina (Miller et al. 1994); aquestes cèl.lules, però, no produeixen insulina. Per tal d'esbrinar si aquestes cèl.lules corresponien a cèl.lules δ es van realitzar dues altres immunodeteccions.

B1) *Pdx1*+PDX1+SOMATOSTATINA Aquí s'observà que en algunes cèl.lules PDX1 i somatostatina colocalitzaven, confirmant així, que eren cèl.lules δ .

B2) *Pdx1*+INSULINA+SOMATOSTATINA Aquesta es realitzà sobretot, per assegurar que insulina (β) i somatostatina (δ) eren mutuament excloents. D'aquesta manera es va concloure que aquestes cèl.lules amb expressió de *Pdx1* i proteïna PDX1, però no insulina, corresponien a les cèl.lules δ .

Un altre resultat esmentat durant la discussió és la detecció, en zones de la perifèria de l'illot, d'una elevada expressió del gen *Pdx1*, que no sempre coincidia amb la detecció per immunofluorescència de la seva proteïna. Aquesta expressió, que en la majoria de cèl.lules es troba en el citoplasma, es trobava retingut a nucli quan el marcatge es detectava de manera més evident. Aquests resultats foren confirmats amb la tècnica de tinció per DAPI, on els nivells elevats de mRNA de *Pdx1* coincidien amb la fluorescència blava del marcatge a nuclis. Aquestes observacions porten a inferir un altre possible procés de regulació de *Pdx1*, en aquest cas posttranscripcional o pretraduccional, com seria el control del transport de mRNA de nucli cap a citoplasma, regulant així la producció i funció de PDX1, tal i com passa amb d'altres gens regulats a múltiples nivells (Cole and Saavedra 1997); (Ruvolo et al. 2001); (Hodge DL 2002).

Antecedents de la no correspondència de l'mRNA i la proteïna PDX1 es troben en els experiments realitzats per Stoffers i col. (1999), i Miller i col. (1994), on analitzant l'expressió de *Pdx1* en el teixit duodenal adult, observen de manera inesperada, que els nivells de mRNA i de proteïna PDX1 no sempre coincideixen. Mentre que l'expressió detectada de mRNA de *Pdx1* és restringida a la submucosa del duodè, la proteïna PDX1 es localitza exclusivament a les cèl.lules epitelials de la mucosa intestinal (Miller et al. 1994); (Stoffers et al. 1999). Aquestes diferències evidents entre l'expressió de *Pdx1* a nivell de mRNA i a nivell de proteïna, els porten a suggerir una regulació de l'expressió del gen *Pdx1* a nivell posttranscripcional, probablement com a resposta a diferents senyals metabòliques. La traducció podria anar lligada a l'estabilitat del mRNA, i l'estabilitat de la proteïna pot anar lligada al temps de supervivència de l'epiteli intestinal.

S'han descrit observacions similars, durant la regeneració pancreàtica provocada per una pancreotomia parcial, on els nivells de proteïna PDX1 es veuen marcadament augmentats, mentre que els nivells de mRNA no varien. Això els porta, de nou, a suggerir que els canvis observats en la producció de la proteïna podrien ser deguts a una regulació de l'expressió del gen *Pdx1* a nivell posttranscripcional (Sharma et al. 1999).

C) *Pdx1*+GLUCAGÓ+PDX1

Un altre resultat obtingut en aquest treball, que era interessant d'analitzar més detalladament, va ser l'observat en realitzar una doble immunodetecció amb els anticossos anti-PDX1 i anti-glucagó, sobre una hibridació *in situ* de *Pdx1*. Sorprenentment, els tres marcatges coincidien en algunes cèl.lules localitzades, majoritàriament, a la perifèria dels illots. Això representa que en certes cèl.lules α (anomenades segons la producció de l'hormona del glucagó)

hi ha expressió i producció de PDX1. Tot i que alguns autors apunten a un possible paper inhibidor de PDX1 sobre l'expressió del gen del glucagó en les cèl.lules α (Ritz-Laser et al. 2003), els resultats obtinguts confirmen observacions d'altres autors, que demostren que PDX1 no té cap efecte sobre el glucagó endogen en aquestes cèl.lules (Serup et al. 1996); (Watada et al. 1996).

Aquest treball descriu l'expressió de *Pdx1* en totes les cèl.lules endocrines pancreàtiques analitzades $-\alpha, \beta$ i δ del ratolí adult. Tal com alguns factors de transcripció que s'expressen en un determinat tipus cel.lular poden actuar, bé com a capacitadors (aquest és el cas de l'expressió de PDX1 en les cèl.lules precursors pancreàtiques -tant endocrines, com exocrines-), bé com a factors d'especificació, l'expressió a nivells basals de *Pdx1* en totes les cèl.lules endocrines analitzades en el pàncrees del ratolí adult pot estar manifestant la seva actuació com a factor capacitador per a la renovació cel.lular endocrina o el manteniment de l'identitat pancreàtica. Fins no fa massa, es creia que el pàncrees i, en concret les cèl.lules β , no tenien la capacitat de regenerar i que el número de cèl.lules existents en el naixement es mantenia al llarg de la vida. Tanmateix, sembla ser que la capacitat regenerativa dels illots pancreàtics, es dona a una taxa substancial en l'adult (Finegood et al. 1995); (Bonner-Weir 2000), tant per mecanismes de replicació (Dor et al. 2004), com transdiferenciació (Lipsett and Finegood 2002), com de neogènesi. Tal com es detalla en la introducció, els mecanismes pels quals es dona aquesta neogènesi i l'origen de les cèl.lules progenitores és encara molt controvertit i existeix diversitat d'opinions entre diferents autors (Zajicek et al. 1990); (Finegood et al. 1995); (Zulewski et al. 2001); (Ianus et al. 2003).

Un dels problemes clau per a la identificació de les cèl.lules progenitores en el pàncrees adult, és la falta de marcadors específics que defineixin aquestes cèl.lules. S'ha proposat la nestina com a marcador d'aquestes cèl.lules progenitores (Lumelsky i col. 2001), mentre la seva especificitat és posada en dubte per d'altres autors (Lardon et al. 2002); (Selander and Edlund 2002). Tot i que la recerca de factors reguladors implicats en el desenvolupament pancreàtic ha avançat molt durant els últims anys, encara queden molts temes per resoldre sobre com els diferents factors interactuen per formar el programa genètic que controla el desenvolupament pancreàtic i l'especificació dels diferents llinatges cel.lulars. Així doncs, tenint en compte els resultats obtinguts en aquest treball, és arriscat definir el tipus cel.lular segons l'expressió d'un sol factor determinat; ja que tal com fan palès els resultats exposats, un determinat factor de transcripció (en aquest cas PDX1) es pot estar expressant en diferents tipus cel.lulars (α, β, δ) i segons els seus nivells d'expressió i/o les interaccions proteïques que hi formi, podria estar realitzant funcions diferents i per tant, la seva expressió no definiria el tipus cel.lular. És a dir, en comptes d'entendre l'especificació final d'un determinat llinatge cel.lular com el resultat de l'acció d'uns gens clau específics, s'entendria com una xarxa de gens actuant en combinació i en períodes o finestres de temps definits. El principal seria l'existència d'un equilibri de tots aquests factors que determinaria el llinatge cel.lular i/o la funció. En el cas de les primeres cèl.lules α que apareixen durant la formació dels primordis pancreàtics, tot i que aquestes

cèl.lules presenten unes característiques (per exemple en el conjunt de gens que expressen) força diferents de les que tindran la resta de cèl.lules α d'aparició posterior, aquestes són anomenades cèl.lules α , sense necessitat de definir un nou subtipus cel.lular (Wilson et al. 2002). Amb això es vol al·ludir al concepte de llinatge cel.lular com a unitats amb més plasticitat cel.lular i no tant determinatives.

En resum, la detecció d'expressió de *Pdx1* en cèl.lules dels illots productores de glucagó, dóna una idea de la importància del nivell d'expressió de cada factor de transcripció en un determinat tipus cel.lular per tal de generar una determinada resposta. Així, la funció final d'una xarxa gènica, podria estar definida no tant pels seus components, com pel seu nivell d'expressió. Les diferents concentracions de factors, provocarien la formació de complexos diferents i, per tant, la generació de respostes igualment diverses. En aquest treball es ressalta la importància d'ampliar la informació que es té dels diferents llinatges cel.lulars que formen els illots i també dels illots en conjunt, per tal d'estudiar aquests factors reguladors en el seu propi context i identificar-ne les veritables capacitats i característiques.

Pdx1 podria estar regulat a nivell posttranscripcional i pretraduccional

Les dades aportades per aquest treball afegixen nova informació sobre una possible regulació postranscripcional/pretraduccional de *Pdx1*. Aquest procés de regulació es podria donar per diferents vies, que s'exposen a continuació, de manera que podrien ser independents de la transcripció.

Un dels models que permetria explicar els resultats que s'exposen seria un procés de regulació semblant al que es dóna en el cas de IFN- γ , en els processos d'inflamació. Aquest, presenta un mecanisme de regulació posttranscripcional que modula l'expressió de mRNA de IFN- γ , en les cèl.lules NK (*natural killer*) estimulades per les interleucines-12 (IL-12), a través d'una retenció nuclear del seu mRNA. Aquesta acumulació de mRNA continua un cop acabada l'activitat transcripcional, fins que es rep un segon estímul provocat per citocines. El segon estímul provoca un moviment nucleo-citoplasmàtic del mRNA independent de la transcripció, que permet una resposta ràpida i robusta enfront els processos d'inflamació (Hodge DL 2002).

En el cas de *Pdx1*, on també és necessària una resposta ràpida davant de l'augment dels nivells de glucosa en sang, aquesta resposta es podria donar a diferents nivells:

- com ja s'ha demostrat, a nivell de la transactivació del promotor de *Pdx1*. La presència d'elevades concentracions de glucosa augmenta l'activitat transcripcional del promotor del gen *Pdx1*. Aquesta activació es pot donar a través de l'estimulació -per la glucosa- d'altres factors com són els membres de la família HNF, per unir-se al promotor (Campbell and Macfarlane 2002).

- a nivell de l'activació del gen de la insulina, existeix una resposta ràpida a l'augment de glucosa, duta a terme pel *pool* de proteïna PDX1 que es troba en el citoplasma. Quan la glucosa arriba a les cèl.lules β , es produeix una fosforilació de PDX1, que és translocada a nucli on actua

com a factor de transcripció activant l'expressió del gen de la insulina, unint-se a les caixes A del seu promotor (Elrick and Docherty 2001).

- adicionalment, a partir dels resultats obtinguts s'hipotetitza que, degut a una transcripció massa elevada del gen *Pdx1*, l'mRNA sobrant quedés retingut a nucli a l'espera que fos necessària més proteïna PDX1; aleshores s'activaria el transport de l'mRNA retingut, cap al citoplasma on es donaria la traducció. En algunes publicacions s'esmenta que el transport de mRNA nucli-citoplasma pot dependre de proteïnes específiques que es troben a nucli, fent que l'interacció amb aquestes proteïnes pugui ser el factor limitant (revisat a (Dreyfuss et al. 1993)); (Cole and Saavedra 1997).

Aquesta acumulació de mRNA de *Pdx1* a nucli es podria donar: bé, promovent la retenció nuclear del mRNA de *Pdx1*, o bé, estabilitzant-ne les formes nuclears de mRNA. Aquestes dues vies podrien actuar de forma independent o conjunta, tot i que la retenció nuclear sembla més plausible, ja que una estabilització del mRNA no impediria el seu transport de nucli a citoplasma. Podria esdevenir-se que una senyal primària activés la transcripció de *Pdx1* i aquest mRNA quedés retingut al nucli fins que un segon estímul -probablement la glucosa-, provoqués la maduració i el transport del nucli al citoplasma. Això permetria una resposta ràpida independent de la transcripció, posttranscripcional i pretraduccional.

Un altre punt important a tenir en compte, respecte com es pot donar aquesta resposta coordinada en el conjunt dels illots per tal de regular l'homeostasi de la glucosa, és l'arquitectura dels illots. És intuïtiu que l'estructura dels illots pot afectar profundament l'interacció entre els diferents tipus cel.lulars i, per tant, la secreció hormonal. Canvis en aquesta estructura provocarien canvis en la secreció hormonal. La localització específica de cada tipus cel.lular en els illots i l'ordre de la secreció de les diferents hormones que produeixen, podrien estar involucrats en la generació dels diferents estímuls que s'acaben de comentar.

En els illots de Langerhans, igual que en la majoria de glàndules endocrines, és necessària una bona irrigació i, per això, es localitzen prop de les arteries i les venes. La microvascularització i la direcció del flux sanguini dels illots ha estat un tema controvertit des dels anys 70 i s'han proposat diferents models que relacionen el flux sanguini dins dels illots, amb la localització dels diferents tipus cel.lulars i la seva secreció hormonal (Fujita and Murakami 1973). Cada illot es troba irrigat per diferents arterioles, que penetren dins dels illots i es divideixen en nombrosos capil.lars. Aquests capil.lars formen glomèruls que irriguen el conjunt de l'illot, permetent la interacció adient cèl.lula-sang i sang-cèl.lula. Així, els diferents tipus cel.lulars que conformen l'illot, reben els nutrients, hormones i senyals reguladores neurohormonals a través de l'endoteli capil.lar, i a través de l'espai intersticial. Si ens fixem en la localització específica de cada tipus cel.lular dins l'illot, el patró del flux sanguini que l'irriga, ha de tenir un impacte significatiu sobre la capacitat d'aquestes cèl.lules per intercomunicar-se i, per tant, en la resposta que generen.

Els estudis fets per analitzar com es dona aquest flux sanguini dins els illots observen diferents patrons de microvascularització, depenent de l'espècie (Murakami et al. 1993). Segons

aquests estudis, en el ratolí, la rata i el conill, el flux sanguini entraria per la perifèria de l'illot i per tant les primeres cèl.lules irrigades serien les cèl.lules no- β ; posteriorment aquest flux seguiria cap al nucli de l'illot, on irrigaria les cèl.lules β . Així doncs, les primeres hormones secretades serien el glucagó, SST i PP. Aquestes hormones inicialment secretades, tindrien un efecte regulador intra-illot sobre la secreció d'insulina per les cèl.lules β . A la vegada, la insulina seria secretada, sense afectar la secreció dels altres tipus cel.lulars. En d'altres espècies com el cavall o el mono, aquest flux sanguini entra pel nucli de l'illot i segueix cap a la perifèria. Però en aquestes espècies, les cèl.lules no- β es troben al nucli, mentre que les cèl.lules β es troben a la perifèria. Així doncs, tal com passa en el ratolí, les hormones secretades per les cèl.lules no- β , tindrien un efecte regulador sobre la secreció d'insulina de les cèl.lules β (revisat a (Brunicardi et al. 1996)).

En aquest context i combinant totes les dades obtingudes sobre l'expressió dels gens ParaHox en les cèl.lules α en aquest treball, s'hipotetitzava que aquests gens puguin intervenir en la homeostasi de la glucosa: regulant el glucagó, ja sigui unint-se directament al seu promotor, com és el cas de *Cdx2/3*, o regulant algun altre factor, que al seu torn estigui implicat en la regulació del gen del glucagó. D'aquesta manera, i degut a l'arquitectura específica descrita en els illots de ratolí, la regulació del glucagó, estaria d'alguna manera regulant la secreció d'insulina i, per tant, intervenint en el correcte manteniment de l'homeostasi de la glucosa de l'organisme.

Com a conclusió, sembla evident que l'expressió del gen *Pdx1* és regulada a molts nivells, probablement, com a resposta a diferents senyals metabòliques, essent molt més complexa del que es creia. Per tant, els resultats sobre la regulació de l'expressió de *Pdx1* basats solament en la producció de mRNA o en la detecció de la seva proteïna han de ser interpretats cautelosament.

4. PAPER DELS GENS PARAHOX EN LES LÍNIES CEL.LULARS α TC1 I β TC6

Quin paper podrien tenir els gens ParaHox en la regulació del gen de la insulina?

Es va creure interessant analitzar si els gens ParaHox, majoritàriament expressats en les cèl.lules α del pàncrees del ratolí adult, (excepte *Pdx1*, que s'expressa principalment en les cèl.lules β), podrien intervenir en la regulació del gen de la insulina. Per tant, es van clonar tots els gens ParaHox en vectors d'expressió -incloent almenys un intró per tal de garantir l'estabilitat del mRNA i el correcte transport nucleo-citoplasmàtic (le Hir et al. 2003)- i es va fer una construcció amb el promotor de la insulina II de ratolí per tal que controlés l'expressió del gen *reporter* de la luciferasa. Es van realitzar cotransfeccions en dues línies cel.lulars diferents: les β TC6, que són cèl.lules β pancreàtiques de ratolí i les α TC1, que són cèl.lules α pancreàtiques, també de ratolí. Les transfeccions es van realitzar a dues concentracions

diferents de glucosa: a elevada concentració (25 mM) i a una baixa concentració (0,5 mM), per tal de poder tenir en compte l'efecte que aquest nutrient pot tenir sobre els diferents factors. És ben conegut que la proteïna PDX1, així com molts altres elements que formen part del complex transcripcional del promotor de la insulina, necessita ser fosforilada per efecte de la glucosa, per tal de poder-se translocar al nucli i activar la transcripció del gen de la insulina (Macfarlane et al. 1999).

Per a les transfeccions dels gens ParaHox es van utilitzar cèl.lules β que és en aquestes cèl.lules on es dona normalment la transcripció del gen de la insulina i es volia veure si aquests gens eren capaços de fer una funció igual o similar a PDX1, unint-se a les caixes A del promotor de la insulina, regulant-ne la seva transcripció, ja fos de manera positiva (com en el cas de PDX1 o CDX2/3) o negativa inhibint-ne la seva activació, tal com es dona en el cas de CDX4 en les cèl.lules β (veure més endavant). A més, els treballs de Marshak i col. (1996) demostren que ni la sobreexpressió de PDX1, ni l'exposició a elevades concentracions de glucosa tenen efectes inhibidors sobre la transactivació del promotor del gen de la insulina en la línia cel.lular β TC6 (Marshak et al. 1996), suggerint que la repressió observada en d'altres línies cel.lulars (Seijffers et al. 1999) pot ser deguda a l'existència d'un factor que seria limitant en aquestes línies, però no en les β TC6. Això les feia una línia cel.lular útil per veure l'efecte que podien tenir altres factors de transcripció ParaHox sobre l'activació del promotor de la insulina, sense que el seu efecte quedés emmascarat per falta d'algun factor limitant.

També es van realitzar transfeccions dels gens ParaHox a cèl.lules α , ja que a més de ser les cèl.lules endocrines on s'expressen la majoria de gens ParaHox (tal com es descriu en el capítol II), i participar activament en el control de l'homeostasi de la glucosa de l'organisme, no contenen PDX1 endogen però expressen molts dels factors específics dels illots, que permeten l'activitat d'un promotor de la insulina exogen quan PDX1 és transfectat en aquestes cèl.lules (Serup et al. 1996). Aquest fet és indicador que en les cèl.lules α existeix la maquinària necessària per a formar el complex transcripcional per a l'activació del promotor del gen de la insulina i que, per tant, és un sistema molt adient per estudiar la possible funció que els altres gens ParaHox poden tenir en la regulació d'aquest gen.

4.1. PDX1 en β TC6 i α TC1

Les primeres transfeccions van servir per determinar el temps de posttransfecció necessari per observar els efectes de la sobreexpressió de la proteïna PDX1 en la línia cel.lular β TC6. Així, es van comparar els resultats obtinguts després de 24 i 48 hores de transfecció. A 48 hores s'observava una activació més elevada del promotor del gen de la insulina que a 24 h. Aquests resultats podien ser deguts a: i) que el temps de producció de mRNA fos més gran, ii) que degut a una elevada estabilitat de la proteïna, aquesta s'acumulés i així l'activació fos més elevada, iii) una resposta indirecta sobre l'activació del promotor, mitjançant una elevada producció de proteïna PDX1, que permetés l'activació o *feed back* positiu de PDX1 sobre d'altres factors de

transcripció que podrien interaccionar de manera sinèrgica amb el promotor de la insulina, produint així, una resposta més robusta. Aquests resultats demostraven que eren necessàries 48h de posttranscripció per tal d'obtenir una resposta apropiada a les concentracions de glucosa, com a mínim en les línies cel.lulars i condicions utilitzades pel cultiu. Així doncs, aquestes condicions es van extrapolar per a la resta de transfeccions.

L'observació que la sobreexpressió d'un sol factor de transcripció, -en aquest cas PDX1-, sigui suficient per provocar un augment tan elevat de l'activació del promotor del gen de la insulina, suggereix que, tot i que d'altres factors activadors siguin requerits per a l'activació del promotor, PDX1 seria el factor limitant en les cèl.lules β . Un augment en la concentració de PDX1 es reflecteix en una elevada activació del promotor, significat que els altres factors activadors requerits no en limiten la transactivació i que, per tant, es troben a la cèl.lula en nivells suficients per fer front a un augment de la concentració de PDX1.

D'altra banda, la transfecció de PDX1 en cèl.lules α també és capaç d'activar el promotor del gen de la insulina de manera depenent de la glucosa, tal com ja havien descrit altres autors (Serup et al. 1996); (Watada et al. 1996), confirmant que en les cèl.lules α TC1 existeix la maquinària necessària per transactivar i regular el promotor del gen de la insulina.

4.2. Els altres gens ParaHox a β TC6 i α TC1

L'efecte que provoquen GSH1 i GSH2 sobre la regulació del gen de la insulina, tant en les cèl.lules α TC1 com β TC6, és molt moderada. GSH2 provoca un efecte d'inhibició del promotor a elevades concentracions de glucosa en les cèl.lules β , i aquest mateix efecte es detecta en el cas de GSH1 -encara que de manera menys notòria- en les cèl.lules α . Aquest efecte d'inhibició es pot donar per diferents vies: bé interferint amb d'altres factors endògens pels llocs d'unió o bé, segrestant factors endògens coactivadors i/o transactivadors, com podria ser PDX1 en el cas de les cèl.lules β .

CDX1 transfectat en les cèl.lules α , no afecta de manera visible l'activitat del promotor del gen de la insulina, mentre que quan és transfectat en cèl.lules β , augmenta 2x la transactivació, suggerint una capacitat per reconèixer i unir-se a dianes del promotor del gen de la insulina. Aquest efecte sobre la transcripció, que es dona de manera independent de la concentració de glucosa en les cèl.lules β , podria estar reflectint un reclutament de factors existents en aquestes cèl.lules, que també podrien estar actuant de manera independentment de la glucosa.

CDX2/3 no té cap efecte significatiu sobre el promotor del gen de la insulina quan és transfectat a cèl.lules β sense presència de glucosa i en canvi, a elevades concentracions del nutrient, transactiva el promotor d'acord amb resultats previs (German et al. 1992). En les cèl.lules α s'observa una inactivació depenent de dosi en absència de glucosa i un efecte no significatiu en presència de glucosa. Així, CDX2/3 té un efecte completament diferent sobre la

regulació del promotor en les línies cel.lulars α TC1 i β TC6, resultant en inhibició o transactivació, depenent del reclutament i interacció amb d'altres factors de transcripció, que serien diferents en les dues línies cel.lulars. Aquesta activació moderada del promotor, comparada amb la que es dona en la transfecció de PDX1, suggeriria que tot i la capacitat de CDX2/3 per unir-se a les caixes A del promotor i transactivar-lo, bé la unió seria menys eficient, probablement degut a una baixa afinitat per les dianes del promotor o bé, presentaria una menor acció sinèrgica amb altres factors requerits per a la formació del complex de transcripció.

Aquestes dades indiquen que un mateix factor de transcripció pot dur a terme funcions diferents en diferents tipus cel.lulars, ja que la seva funció depèn d'altres factors de transcripció i/o coactivadors, alguns dels quals són específics de tipus cel.lular i això fa que la formació del complex necessari per a l'activació d'un promotor determinat només es pugui formar de manera eficient en algunes cèl.lules. Per exemple, aquest és el cas de l'activació del promotor del gen de l'elastasa en les cèl.lules exocrines del pàncreas (Swift et al. 1998).

En la transfecció de CDX4 a elevades concentracions de glucosa, s'observa una resposta inversa a la descrita per CDX2/3 en les dues línies cel.lulars utilitzades, o a PDX1, en les cèl.lules β . Aquesta resposta és depenent del tipus cel.lular i de la concentració de glucosa. Així doncs, a baixes concentracions de glucosa, no es detecta cap efecte visible sobre la transactivació del promotor del gen de la insulina a cap dels dos tipus cel.lulars analitzats; mentre que a elevades concentracions de glucosa, existeix una forta inhibició (fins arribar a nivells pràcticament nuls) en les cèl.lules β i una transactivació de fins a 10x en les cèl.lules α (del tot comparable amb la obtinguda per PDX1 en les cèl.lules β en presència de glucosa).

Es poden hipotetitzar diferents escenaris per explicar els resultats obtinguts amb la transfecció de CDX4 a elevada concentració de glucosa. La marcada inhibició observada en cèl.lules β , suggereix la unió de CDX4 a regions *cis* del promotor del gen de la insulina. Aquesta inhibició podria ser deguda a la competència de CDX4 amb algun factor endogen pel seu lloc d'unió al promotor, o que CDX4 a l'unir-se al promotor, estigués reclutant proteïnes d'inhibició que provocarien el silenciament de l'activitat del promotor. Aquesta inhibició també podria estar provocada per la disrupció i/o segrestament d'una sola proteïna o d'un complex proteic d'activació, ja que l'homeodomini, a més de ser un domini d'activació, actua com un domini d'interacció proteïna-proteïna (Ohneda et al. 2000), per tant CDX4 pot unir-se al PDX1 endogen segrestant-lo. Com ja s'ha esmentat, al ser PDX1 un factor limitant en aquestes cèl.lules, s'inhibiria l'activitat del promotor.

En el cas de les cèl.lules α , sembla evident la unió de CDX4 al promotor del gen de la insulina. Aquesta unió provocaria un reclutament de factors de transcripció o coactivadors específics de cèl.lula α , que farien possible l'elevada transactivació del promotor. Com ja s'ha esmentat, la transactivació que es detecta per CDX4 en aquestes cèl.lules, és d'un ordre de magnitud molt semblant al detectat en el cas de PDX1 en les cèl.lules β , a la mateixa concentració de glucosa. Tot i la similitud en la resposta, CDX4 presenta un efecte de saturació a elevades dosis de factor de transcripció que no s'observa amb PDX1. L'efecte de saturació podria

ser la conseqüència d'un excés de CDX4 que segregaria algun factor (que es trobés a nivells limitants en les cèl.lules α) necessari per la formació del complex transcripcional i l'activació del promotor (Peers et al. 1994); (Peshavaria et al. 1997). Això faria que no es pogués formar el complex proteic adient en el promotor, per tal de transactivar-lo.

4.3. Formació de complexos de transactivació.

Ja ha estat descrit anteriorment que altres proteïnes amb homeodomini, com les proteïnes LMX1.1 i CDX2/3 (German et al. 1992), ISL1 (Karlsson et al. 1990), HNF1 α (Emens et al. 1992), HMGI(Y) poden activar el *minienhancer* A/E en cooperació amb E47 de manera similar a com ho fa PDX1 (o bé, unint-se a les mateixes dianes que PDX1) (Ohneda et al. 2000). De la mateixa manera, els resultats obtinguts en aquest treball indiquen que les proteïnes ParaHox són capaces de regular l'activitat del promotor del gen de la insulina, ja sigui unint-se directament a la caixa A, on s'uneix PDX1 i/o per unió i cooperació amb algun altre element present en aquestes cèl.lules. Entre aquests, hi ha les proteïnes bHLH, amb les que podrien actuar de forma sinèrgica (de manera semblant a com ho fa PDX1) per tal de regular el promotor de forma positiva o negativa. Així doncs, la majoria de factors de transcripció actuen formant complexos de dues maneres: bé, formant heteròmers, que permeten la unió amb una determinada diana (aquest seria l'exemple de les proteïnes bHLH, que formen un heterodímer per tal d'unir-se a les caixes E) o bé, per interacció sinèrgica entre els complexos que es troben en diferents caixes (seria el cas de la sinèrgia que es dona entre els elements del *minienhancer* E/A) (German et al. 1992). Els elements que formen aquests complexos poden ser: proteïnes d'expressió ubícua o generalitzada (com és E47) o proteïnes d'expressió específica (com BETA2/NeuroD). Les proteïnes d'expressió específica de teixit, són les que donen especificitat en la formació del complex, ja que aquest només es formarà en el teixit que expressi la proteïna.

La capacitat que tenen altres factors amb homeodomini (com els codificats pels gens ParaHox) per substituir la funció de PDX1 en la formació del complex d'activació en el promotor de la insulina (Rudnick et al. 1994), pot explicar l'observació que les cèl.lules β continuen expressant insulina quan *Pdx1* és deletat pel sistema *Cre/loxP* (Ahlgren et al. 1998). Aquesta redundància també explicaria els nivells relativament alts d'insulina que es troben en les cèl.lules β humanes NES2Y, que no expressen *Pdx1* (Macfarlane et al. 1997), així com les concentracions sostingudes d'insulina quan l'expressió de *Pdx1* es veu reduïda en les cèl.lules β utilitzant el mètode de RNA antisentit (Kajimoto et al. 1997). Un altre exemple es dona per la presència d'insulina en les cèl.lules β de la rata de sorra *Psamomys obesus*, que no presenta PDX1 en els illots del ratolí nouat i adult (Leibowitz et al. 2001).

Tal com queda palès en els resultats obtinguts en els experiments de transfecció realitzats en aquest treball, juntament amb estudis sobre la formació del complex transcripcional del promotor del gen de la insulina (en els que es determina la combinació i els nivells de factors de transcripció requerits per a l'activació del promotor en les cèl.lules β pancreàtiques), les

diferents concentracions i les possibles combinacions dels mateixos factors de transcripció poden donar respostes molt diferents als mateixos estímuls. Així, segons els nivells de factors de transcripció, es formarien diferents complexos transcripcionals, que podrien funcionar com activadors en un determinat tipus cel.lular i com a inhibidors en un altre.

En aquest context, l'expressió restringida a cèl.lula β de la insulina, semblaria a *priori* deguda a que les interaccions entre les proteïnes que formen el complex transcripcional fossin altament específiques i que, per tant, proteïnes diferents que es trobessin en altres cèl.lules no poguessin substituir aquestes interaccions. Per tant, si manqués qualsevol de les proteïnes que formen el complex, la transcripció del gen de la insulina estaria silenciada. Davant l'observació que cap d'aquestes prediccions és completament certa, Ohneda i German (2000) proposen una formació del complex transcripcional més elàstica i versàtil, on molts dels factors podrien estar capacitant la formació del complex, però molts d'ells podrien ser reemplaçats per d'altres factors, encara que potser les interaccions sinèrgiques entre ells no fossin tan eficients o, fins i tot, inexistents. En resum, les concentracions de factors en la cèl.lula, serien per tant, de vital importància. L'excés d'un determinat element podria estar-ne segregant un altre, que si es trobés en concentracions limitants, no podria formar el complex i, per tant, la transcripció quedaria silenciada (Ohneda et al. 2000).

Un altre punt a tenir en compte a l'hora d'interpretar els resultats obtinguts en l'anàlisi de l'expressió dels gens ParaHox en aquestes dues línies cel.lulars pancreàtiques endocrines és el promotor utilitzat a l'hora de fer la construcció del promotor de la insulina amb el gen reporter de la luciferasa. En rosegadors, tant ratolins com rata, existeixen dos gens no-al·lèlics del gen de la insulina (Davies et al. 1994); (Duvillie et al. 1998); (Soares et al. 1985). El gen I és un derivat d'un retropseudogen processat que, excepcionalment, ha conservat funció. En canvi, els gens de la insulina II de rata i ratolí serien els ortòlegs del gen de la insulina humana. Per tant, es va amplificar el promotor de la insulina II de ratolí, que està organitzat en 3 exons i dos introns i es troba al cromosoma 7. S'ha descrit que un fragment de -340 bp del promotor del gen la insulina humana (Petersen et al. 1994) i un fragment d'aproximadament -600 bp del promotor del gen de la insulina II de rata (Hanahan 1985), contenen tots els dominis o elements reguladors de la transcripció del gen que responen a les senyals fisiològiques a cèl.lules β . Basant-nos en l'alineament de les seqüències disponibles al banc de dades i utilitzant les dianes de restricció més convenients per tal de realitzar el clonatge, vam amplificar una regió de -640 bp del promotor del gen de la insulina II de ratolí.

Si es tenen en compte els resultats descrits anteriorment, on PDX1 i glucagó colocalitzaven en les mateixes cèl.lules, seria lògic pensar que PDX1 pogués transactivar el gen de la insulina en aquestes cèl.lules i que per tant és pogués donar col.localització de glucagó i insulina. El fet que això no es doni podria estar indicant l'existència de regions més llunyanes -situades més a 5' del promotor del gen de la insulina-, que serien actives en cèl.lules α i que podrien provocar el silenciament de l'expressió del gen de la insulina en aquestes cèl.lules. Una determinada

combinació de factors repressors o la falta d'una determinada combinatòria de factors activadors en aquestes cèl.lules, provocaria l'efecte de silenciament del gen.

4.4.Efectes de la glucosa

Les cèl.lules β responen a l'increment de glucosa en sang, augmentant la biosíntesi i l'alliberament d'insulina. La seva producció i alliberament requereix una fina regulació per tal de mantenir l'homeostasi de la glucosa en l'organisme. La glucosa controla els nivells de mRNA de la insulina, promovent-ne la transcripció i augmentant-ne l'estabilitat del mRNA (revisat a (McKinnon and Docherty 2001)). La concentració de glucosa, també és la responsable de la regulació de molts factors de transcripció que s'uneixen al promotor del gen de la insulina. Un dels factors més ben estudiats és PDX1. La seva capacitat d'unió al promotor del gen de la insulina és regulada, ràpidament (10-15 minuts), per la concentració de glucosa (German and Wang 1994); (Sharma et al. 1995); (Marshak et al. 1996); (Odagiri et al. 1996), que incrementa el potencial activador del seu domini d'activació (Petersen et al. 1998). En aquest context ha estat demostrat, que a baixes concentracions de glucosa, la majoria de PDX1 es troba en citosol a la perifèria nuclear i que, quan els nivells de glucosa augmenten, PDX1 és translocat cap al nucleoplasma (Rafiq et al. 1998). Aquest moviment és depenent de fosforilació, i aquesta fosforilació es dona mitjançant una cascada on intervenen PI3 cinasa i SAPK2 (Macfarlane et al. 1994); (Macfarlane et al. 1997) com a resposta als canvis de glucosa i insulina extracel.lular (Elrick and Docherty 2001).

Com s'ha anat detallant en cada un dels apartats, els gens ParaHox tenen respostes diferents sobre la regulació del promotor del gen de la insulina, segons el tipus cel.lular i la concentració de glucosa present en el medi. Així, s'observa que en les cèl.lules β , CDX2/3 provoca un augment en la transactivació del promotor a elevades concentracions de glucosa, suggerint que aquest factor respon de manera similar a PDX1, encara que de manera molt menys eficient. CDX4 en les mateixes condicions, provoca una forta inhibició del promotor en aquestes cèl.lules. Tot i que CDX4 pogués ser fosforilat per la glucosa per tal d'unir-se al promotor del gen de la insulina, no seria capaç de transactivar-lo i, per tant, a l'entrar amb competència amb el PDX1 endogen, provocaria una forta inhibició. Ni GSH1 ni GSH2 semblen tenir cap efecte visible sobre el promotor del gen de la insulina segons la concentració de glucosa, en cap de les dues línies cel.lulars analitzades.

Pel que fa a les cèl.lules α , els efectes de la sobreexpressió de CDX1 i CDX2/3 a les diferents concentracions de glucosa són moderats. En canvi, en la transfecció de CDX4 s'observa una elevada transactivació del promotor que, com ja s'ha dit abans, és equiparable a la que es dona quan es transfecta PDX1 en les cèl.lules β a elevades concentracions de glucosa; suggerint una regulació de CDX4 controlada pels nivells de glucosa, que inclús es podria hipotetitzar que es donés donar (com és el cas de PDX1) per fosforilació. Aquests resultats subratllen l'efecte de la concentració de glucosa sobre l'activitat transactivadora d'alguns factors de transcripció ParaHox, provocant una resposta activadora en alguns casos i inhibidora en d'altres.

Un tema bastant discutit en els darrers anys ha estat el de la glucotoxicitat, provocada per una exposició crònica de les cèl.lules β a elevades concentracions de glucosa, com seria la utilitzada en aquest treball (25mM) (revisat a (Melloul et al. 2002)). Alguns autors no descriuen cap efecte deleteri provocat per aquestes elevades concentracions (Welsh and Hellerstrom 1990); (Eizirik et al. 1991), mentre que d'altres, descriuen una disminució en la secreció d'insulina (Sako and Grill 1990); (Kaiser et al. 1991).

A la línia de cèl.lules β HIT-T15 cultivades a elevades concentracions de glucosa, la capacitat d'unió dels factors PDX1 i RIPE3b1-Act/C1 al promotor del gen de la insulina es veu reduïda (Sharma et al. 1995), mentre que en la línia de cèl.lules β TC6 (utilitzada en aquest treball) només disminueix la capacitat d'unió de RIPE3b1-Act/c1, però no la de PDX1 (Poitout et al. 1996). Les transfeccions que s'han realitzat amb PDX1 sobre la línia de cèl.lules β TC6, a una concentració de 25mM de glucosa, confirmen aquestes observacions i suggereixen que, si bé la capacitat d'unió de RIPE3b1-Act/C1 al promotor del gen de la insulina podria veure's disminuïda, aquest no seria un factor limitant en la formació del complex transcripcional, ja que els resultats obtinguts demostren una elevada activació del promotor a elevada concentració de glucosa, apuntant principalment a PDX1 com a factor limitant.

Tot i que la sensibilitat de les cèl.lules β a la concentració de glucosa varia entre les diferents espècies (Korsgren et al. 1990) i que això es pot veure reflectit en la línia cel.lular utilitzada, les cèl.lules en cultiu són un bon model d'estudi i una eina molt valuosa per tal d'analitzar com diferents factors de transcripció -en aquest cas els codificats pels gens ParaHox- poden funcionar en condicions concretes de concentració de factor i/o de glucosa que mimetitzin determinades condicions fisiològiques, com són la ingesta i el dejú, i així, donar una visió de com aquests factors poden estar comportant-se dins la seva unitat funcional i estructural.

En conclusió, aquest treball demostra que en cèl.lules β , cap gen ParaHox pot substituir de manera eficient PDX1 en la transactivació del promotor de la insulina depenent de la concentració de glucosa, ja que CDX2/3 pot fer-ho, però a molt elevades concentracions i CDX1 transactiva només moderadament i no és sensible a la glucosa. En canvi, en les cèl.lules α , CDX4 transactiva de manera eficient el promotor, provocant una forta resposta depenent de la concentració de glucosa, molt similar a la de PDX1 en les cèl.lules β .

5. EN CONCLUSIÓ

La identificació i caracterització de factors de transcripció pancreàtics ha revelat el seu important paper, no només en el manteniment de les cèl.lules β madures, sinó en el manteniment general de l'homeostasi de l'organisme. Tal com es pot apreciar en el diagrama que es presenta a continuació (Fig. 3), els processos que modulen l'activitat gènica dels factors de transcripció pancreàtics, són xarxes molt complexes on els mateixos components poden

actuar a diferents estadis i/o combinats amb d'altres factors, per tal de realitzar funcions diferents depenent del temps, de l'estadi i dels nivells d'expressió. En aquest treball es ressalta la necessitat d'un coneixement detallat de les bases moleculars, l'acció i les interaccions entre les proteïnes que formen aquestes xarxes gèniques, per tal d'aconseguir modular el patró d'expressió d'aquests gens i arribar a desenvolupar camins que proporcionin noves opcions terapèutiques per la diabetis. En aquest treball es descriuen els gens ParaHox com a components d'aquestes xarxes gèniques, demostrant l'expressió de tots ells en les cèl.lules α dels illots pancreàtics. Per últim, es suggereix la seva implicació en el manteniment de l'estat diferenciat d'aquestes cèl.lules i es proposa la seva implicació en la regulació de l'homeostasi de la glucosa, obrint noves vies per explorar teràpia gènica basada en les cèl.lules α .

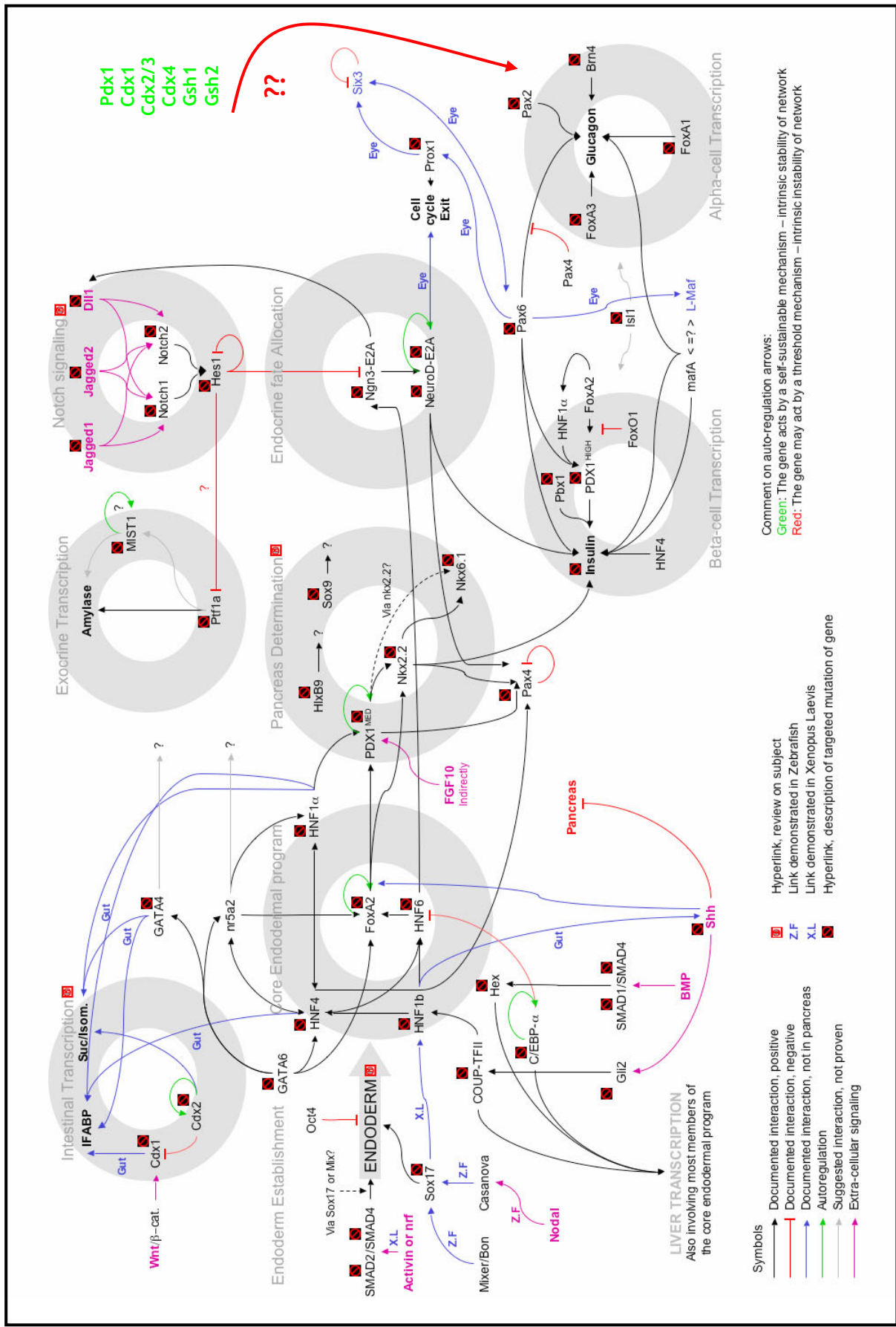


Figura. 3 Interaccions reguladores durant el desenvolupament pancreàtic. Tota la informació suplementària a cada factor es troba online a <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1058-8338/suppmat>. Modificat de Jensen, 2004.

Conclusions

1. RESPECTE L'EXISTÈNCIA D'UN POSSIBLE *PDX2* (*IPF2*) EN EL GENOMA HUMÀ

- Actualment no existeix cap gen paràleg a *Pdx1* en el genoma humà, fet que implicaria que després de les duplicacions gèniques a l'origen dels vertebrats, els possibles gens duplicats excepte *Pdx1*, haurien esdevingut no funcionals, causant finalment, la seva desaparició del genoma.

2. RESPECTE L'EXPRESSIÓ DELS GENS *PARAHOX* EN TEIXITS ADULTS

- Tots els gens *ParaHox* a més d'expressar-se durant el desenvolupament embrionari, s'expressen en diversos teixits adults. Es remarca l'elevada expressió de *CDX4* a ronyó, fins al moment només descrita durant el desenvolupament.

- Tots els gens *ParaHox* s'expressen en el pàncrees de ratolí adult. *Pdx1* és l'únic gen *ParaHox* que s'expressa a nivells detectables en cèl.lules β . La resta de *ParaHox* s'expressa a les cèl.lules α dels illots pancreàtics.

- L' mRNA de *Pdx1* és troba principalment localitzat al citoplasma de les cèl.lules β i δ , on es produeixen quantitats detectables de *PDX1*. A més, es detecta acumulació de mRNA de *Pdx1* en el nucli de certes cèl.lules, on no és produït proteïna *PDX1*, suggerint un procés de regulació posttranscripcional.

- L'mRNA i la proteïna de *PDX1* es troben a vegades colocalitzant amb el glucagó en algunes cèl.lules de la perifèria dels illots, suggerint que *Pdx1* podria estar-se expressant, almenys a nivells basals en totes les cèl.lules endocrines pancreàtiques, funcionant com a capacitador.

3. TRANSACTIVACIÓ DEL PROMOTOR DEL GEN DE LA INSULINA PELS GENS *PARAHOX*

- En les cèl.lules β TC6, *GSH1* i *GSH2* tenen un efecte inhibidor sobre el promotor del gen de la insulina, tant a elevada com a baixa concentració de glucosa. *CDX1* és capaç d'activar aquest promotor a elevades concentracions, independentment de la concentració de glucosa. *CDX2/3*, a elevades dosis transactiva aquest promotor en presència de glucosa, mentre que *CDX4*, en presència de glucosa, provoca una forta inhibició dependent de dosi. Ni *CDX2/3*, ni *CDX4* afecten la transactivació del promotor a baixes concentracions de glucosa.

- En les cèl.lules α TC1, *GSH1* i *GSH2* tenen un efecte moderadament inhibidor sobre el promotor del gen de la insulina independentment de la concentració de glucosa. *CDX1*, a elevades concentracions, transactiva moderadament aquest promotor en presència de glucosa, i no té cap efecte aparent en absència. *CDX2/3* té un efecte inhibidor en absència de glucosa i cap efecte aparent en presència de glucosa. L'efecte més rellevant és l'observat amb *CDX4* que, en presència de glucosa, provoca una forta activació del promotor del gen de la insulina, més evident a baixes concentracions de factor de transcripció.

Bibliografia

A

- Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H (1996) The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 122:1409-1416
- Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H (1998) beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ip1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12:1763-1768
- Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H (1997) Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385:257-260
- Alison M (2002) Hepatic stem cells. *Transplant Proc* 34:2702-2705
- Alpert S, Hanahan D, Teitelman G (1988) Hybrid insulin genes reveal a developmental lineage for pancreatic endocrine cells and imply a relationship with neurons. *Cell* 53:295-308
- Altmann CR, Brivanlou AH (2001) Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int Rev Cytol* 203:447-482
- Ammon HP, Reiber C, Verspohl EJ (1991) Indirect evidence for short-loop negative feedback of insulin secretion in the rat. *J Endocrinol* 128:27-34
- Andersen FG, Jensen J, Heller RS, Petersen HV, Larsson LI, Madsen OD, Serup P (1999) Pax6 and Pdx1 form a functional complex on the rat somatostatin gene upstream enhancer. *FEBS Lett* 445:315-320
- Ang SL, Rossant J (1994) HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78:561-574
- Apelqvist A, Ahlgren U, Edlund H (1997) Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* 7:801-804
- Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H (1999) Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400:877-881
- Argoud GM, Schade DS, Eaton RP (1987) Insulin suppresses its own secretion in vivo. *Diabetes* 36:959-962
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770-776
- Asahara H, Dutta S, Kao HY, Evans RM, Montminy M (1999) Pbx-Hox heterodimers recruit coactivator-corepressor complexes in an isoform-specific manner. *Mol Cell Biol* 19:8219-8225
- Ashizawa S, Brunnicardi FC, Wang XP (2004) PDX-1 and the pancreas. *Pancreas* 28:109-120

B

- Bach I, Mattei MG, Cereghini S, Yaniv M (1991) Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver. *Nucleic Acids Res* 19:3553-3559
- Balavoine G, de Rosa R, Adoutte A (2002) Hox clusters and bilaterian phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* 24:366-373

- Beck F, Erler T, Russell A, James R (1995) Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn* 204:219-227
- Bell GI, Polonsky KS (2001) Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 414:788-791
- Ben-Shushan E, Marshak S, Shoshkes M, Cerasi E, Melloul D (2001) A pancreatic beta -cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. *J Biol Chem* 276:17533-17540
- Bhushan A, Itoh N, Kato S, Thiery JP, Czernichow P, Bellusci S, Scharfmann R (2001) Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development* 128:5109-5117
- Boam DS, Clark AR, Docherty K (1990) Positive and negative regulation of the human insulin gene by multiple trans-acting factors. *J Biol Chem* 265:8285-8296
- Bonner-Weir S (2000) Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24:297-302
- Bonner-Weir S (2000) Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* 11:375-378
- Bonner-Weir S (2000) Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* 141:1926-1929
- Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE (1993) A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42:1715-1720
- Bonner-Weir S, Sharma A (2002) Pancreatic stem cells. *J Pathol* 197:519-526
- Bottinger EP, Jakubczak JL, Haines DC, Bagnall K, Wakefield LM (1997) Transgenic mice overexpressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor beta receptor show enhanced tumorigenesis in the mammary gland and lung in response to the carcinogen 7,12-dimethylbenz-[a]-anthracene. *Cancer Res* 57:5564-5570
- Bramblett DE, Huang HP, Tsai MJ (2000) Pancreatic islet development. *Adv Pharmacol* 47:255-315
- Briaud I, Harmon JS, Kelpel CL, Segu VB, Poitout V (2001) Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes* 50:315-321
- Brooke NM, Garcia-Fernandez J, Holland PW (1998) The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* 392:920-922
- Brunicaudi FC, Stagner J, Bonner-Weir S, Wayland H, Kleinman R, Livingston E, Guth P, Menger M, McCuskey R, Intaglietta M, Charles A, Ashley S, Cheung A, Ipp E, Gilman S, Howard T, Passaro E, Jr. (1996) Microcirculation of the islets of Langerhans. Long Beach Veterans Administration Regional Medical Education Center Symposium. *Diabetes* 45:385-392
- Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR (1997) Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* 88:561-572

C

- Cameron CB, Garey JR, Swalla BJ (2000) Evolution of the chordate body plan: new insights from phylogenetic analyses of deuterostome phyla. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4469-4474
- Campbell SC, Cragg H, Elrick LJ, Macfarlane WM, Shennan KI, Docherty K (1999) Inhibitory effect of pax4 on the human insulin and islet amyloid polypeptide (IAPP) promoters. *FEBS Lett* 463:53-57
- Campbell SC, Macfarlane WM (2002) Regulation of the Pdx1 gene promoter in pancreatic beta-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299:277-284
- Chakrabarti SK, James JC, Mirmira RG (2002) Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding. *J Biol Chem* 277:13286-13293
- Chan SJ, Keim P, Steiner DF (1976) Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1964-1968
- Charite J, de Graaff W, Consten D, Reijnen MJ, Korving J, Deschamps J (1998) Transducing positional information to the Hox genes: critical interaction of cdx gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development* 125:4349-4358
- Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Kontgen F, Beck F (1997) Homeosis and intestinal tumours in *Cdx2* mutant mice. *Nature* 386:84-87
- Chawengsaksophak K, James R, Hammond V.E., Kötgen, F., Beck, F. (1997) Homeosis and intestinal tumors in *Cdx2* mutant mice. *Nature* 386:84-87
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413
- Clark AR, Wilson ME, Leibiger I, Scott V, Docherty K (1995) A silencer and an adjacent positive element interact to modulate the activity of the human insulin promoter. *Eur J Biochem* 232:627-632
- Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 364:412-420
- Cole CN, Saavedra C (1997) Regulation of the export of RNA from the nucleus. *Semin Cell Dev Biol* 8:71-78
- Corbin JG, Gaiano N, Machold RP, Langston A, Fishell G (2000) The *Gsh2* homeodomain gene controls multiple aspects of telencephalic development. *Development* 127:5007-5020
- Cordle SR, Henderson E, Masuoka H, Weil PA, Stein R (1991) Pancreatic beta-cell-type-specific transcription of the insulin gene is mediated by basic helix-loop-helix DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 11:1734-1738
- Cordle SR, Whelan J, Henderson E, Masuoka H, Weil PA, Stein R (1991) Insulin gene expression in nonexpressing cells appears to be regulated by multiple distinct negative-acting control elements. *Mol Cell Biol* 11:2881-2886

Cras-Meneur C, Elghazi L, Czernichow P, Scharfmann R (2001) Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation. *Diabetes* 50:1571-1579

Crowe DT, Tsai MJ (1989) Mutagenesis of the rat insulin II 5'-flanking region defines sequences important for expression in HIT cells. *Mol Cell Biol* 9:1784-1789

D

Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U (1992) Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci* 103 (Pt 2):589-597

Dandoy-Dron F, Monthieux E, Jami J, Bucchini D (1991) Regulatory regions of rat insulin I gene necessary for expression in transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 19:4925-4930

Davidson AJ, Ernst P, Wang Y, Dekens MP, Kingsley PD, Palis J, Korsmeyer SJ, Daley GQ, Zon LI (2003) *cdx4* mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple *hox* genes. *Nature* 425:300-306

Davies PO, Poirier C, Deltour L, Montagutelli X (1994) Genetic reassignment of the insulin-1 (*Ins1*) gene to distal mouse chromosome 19. *Genomics* 21:665-667

Deschet K, Bourrat F, Chourrout D, Joly JS (1998) Expression domains of the medaka (*Oryzias latipes*) *Ol-Gsh 1* gene are reminiscent of those of clustered and orphan homeobox genes. *Dev Genes Evol* 208:235-244

Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret KS (2001) A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128:871-881

Docherty K (2001) Growth and development of the islets of Langerhans: implications for the treatment of diabetes mellitus. *Curr Opin Pharmacol* 1:641-650

Domon-Dell C, Freund JN (2002) Stimulation of *Cdx1* by oncogenic beta-catenin/*Tcf4* in colon cancer cells; opposite effect of the *CDX2* homeoprotein. *FEBS Lett* 518:83-87

Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429:41-46

Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 62:289-321

Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF (1987) Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3434-3438

Duboule D (1998) Vertebrate *hox* gene regulation: clustering and/or colinearity? *Curr Opin Genet Dev* 8:514-518

Duboule D, Dolle P (1989) The structural and functional organization of the murine *HOX* gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *Embo J* 8:1497-1505

Dumonteil E, Laser B, Constant I, Philippe J (1998) Differential regulation of the glucagon and insulin I gene promoters by the basic helix-loop-helix transcription factors E47 and BETA2. *J Biol Chem* 273:19945-19954

- Dutta S, Bonner-Weir S, Montminy M, Wright C (1998) Regulatory factor linked to late-onset diabetes? *Nature* 392:560
- Dutta S, Gannon M, Peers B, Wright C, Bonner-Weir S, Montminy M (2001) PDX:PBX complexes are required for normal proliferation of pancreatic cells during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1065-1070
- Duvillie B, Bucchini D, Tang T, Jami J, Paldi A (1998) Imprinting at the mouse *Ins2* locus: evidence for cis- and trans-allelic interactions. *Genomics* 47:52-57

E

- Eckner R, Yao TP, Oldread E, Livingston DM (1996) Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev* 10:2478-2490
- Edlund H (2002) Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 3:524-532
- Edlund H (2001) Developmental biology of the pancreas. *Diabetes* 50 Suppl 1:S5-9
- Edlund H (2001) Factors controlling pancreatic cell differentiation and function. *Diabetologia* 44:1071-1079
- Edlund H (1998) Transcribing pancreas. *Diabetes* 47:1817-1823
- Eizirik DL, Strandell E, Sandler S (1991) Prolonged exposure of pancreatic islets isolated from "pre-diabetic" non-obese diabetic mice to a high glucose concentration does not impair beta-cell function. *Diabetologia* 34:6-11
- Elrick LJ, Docherty K (2001) Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes* 50:2244-2252
- Emens LA, Landers DW, Moss LG (1992) Hepatocyte nuclear factor 1 alpha is expressed in a hamster insulinoma line and transactivates the rat insulin I gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7300-7304

F

- Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS (2001) Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 345:971-980
- Ferrier DE, Holland PW (2002) *Ciona intestinalis* ParaHox genes: evolution of Hox/ParaHox cluster integrity, developmental mode, and temporal colinearity. *Mol Phylogenet Evol* 24:412-417
- Ferrier DE, Holland PW (2001) Ancient origin of the Hox gene cluster. *Nat Rev Genet* 2:33-38
- Ferrier DE, Minguillon C (2003) Evolution of the Hox/ParaHox gene clusters. *Int J Dev Biol* 47:605-611
- Fiedorek FT, Jr., Kay ES (1995) Mapping of the insulin promoter factor 1 gene (*Ip1*) to distal mouse chromosome 5. *Genomics* 28:581-584
- Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S (1995) Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44:249-256

- Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P (1991) CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64:739-749
- Freund JN, Domon-Dell C, Kedinger M, Duluc I (1998) The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. *Biochem Cell Biol* 76:957-969
- Fujita T, Murakami T (1973) Microcirculation of monkey pancreas with special reference to the insulo-acinar portal system. A scanning electron microscope study of vascular casts. *Arch Histol Jpn* 35:255-263
- Fujitani Y, Kajimoto Y, Yasuda T, Matsuoka TA, Kaneto H, Umayahara Y, Fujita N, Watada H, Miyazaki JI, Yamasaki Y, Hori M (1999) Identification of a portable repression domain and an E1A-responsive activation domain in Pax4: a possible role of Pax4 as a transcriptional repressor in the pancreas. *Mol Cell Biol* 19:8281-8291
- Furlong RF, Holland PW (2002) Were vertebrates octoploid? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:531-544

G

- Galsgaard ED, Gouilleux F, Groner B, Serup P, Nielsen JH, Billestrup N (1996) Identification of a growth hormone-responsive STAT5-binding element in the rat insulin 1 gene. *Mol Endocrinol* 10:652-660
- Gamer LW, Wright CV (1993) Murine Cdx-4 bears striking similarities to the *Drosophila* caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech Dev* 43:71-81
- Gannon M, Gamer LW, Wright CV (2001) Regulatory regions driving developmental and tissue-specific expression of the essential pancreatic gene *pdx1*. *Dev Biol* 238:185-201
- Garcia-Fernández J, Holland PW (1994) Archetypal organization of the amphioxus Hox gene cluster. *370 (6490): 563-566*
- Gehring WJ (1985) The homeo box: a key to the understanding of development? *Cell* 40:3-5
- German M, Ashcroft S, Docherty K, Edlund H, Edlund T, Goodison S, Imura H, Kennedy G, Madsen O, Melloul D, et al. (1995) The insulin gene promoter. A simplified nomenclature. *Diabetes* 44:1002-1004
- German MS, Moss LG, Rutter WJ (1990) Regulation of insulin gene expression by glucose and calcium in transfected primary islet cultures. *J Biol Chem* 265:22063-22066
- German MS, Wang J (1994) The insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucose. *Mol Cell Biol* 14:4067-4075
- German MS, Wang J, Chadwick RB, Rutter WJ (1992) Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev* 6:2165-2176
- Gerrish K, Cissell MA, Stein R (2001) The role of hepatic nuclear factor 1 alpha and PDX-1 in transcriptional regulation of the *pdx-1* gene. *J Biol Chem* 276:47775-47784
- Gerrish K, Gannon M, Shih D, Henderson E, Stoffel M, Wright CV, Stein R (2000) Pancreatic beta cell-specific transcription of the *pdx-1* gene. The role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3beta sites. *J Biol Chem* 275:3485-3492

- Giddings SJ, Carnaghi LR (1988) The two nonallelic rat insulin mRNAs and pre-mRNAs are regulated coordinately in vivo. *J Biol Chem* 263:3845-3849
- Gittes GK, Galante PE, Hanahan D, Rutter WJ, Debase HT (1996) Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* 122:439-447
- Gittes GK, Rutter WJ (1992) Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1128-1132
- Glick E, Leshkowitz D, Walker MD (2000) Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter. *J Biol Chem* 275:2199-2204
- Goodison S, Ashcroft SJ (1993) Human insulin promoter driven reporter gene expression. *Biochem Soc Trans* 21:225
- Goodison S, Kenna S, Ashcroft SJ (1992) Control of insulin gene expression by glucose. *Biochem J* 285 (Pt 2):563-568
- Goodman PA, Medina-Martinez O, Fernandez-Mejia C (1996) Identification of the human insulin negative regulatory element as a negative glucocorticoid response element. *Mol Cell Endocrinol* 120:139-146
- Goudet G, Delhalle S, Biemar F, Martial JA, Peers B (1999) Functional and cooperative interactions between the homeodomain PDX1, Pbx, and Prep1 factors on the somatostatin promoter. *J Biol Chem* 274:4067-4073
- Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F (2000) neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1607-1611
- Gremlich S, Bonny C, Waeber G, Thorens B (1997) Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem* 272:30261-30269
- Grill V, Qvigstad E (2000) Fatty acids and insulin secretion. *Br J Nutr* 83 Suppl 1:S79-84
- Guo RJ, Suh ER, Lynch JP (2004) The Role of Cdx Proteins in Intestinal Development and Cancer. *Cancer Biol Ther* 3
- Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CV, Teitelman G (1995) Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 121:11-18
- Guz Y, Nasir I, Teitelman G (2001) Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* 142:4956-4968

H

- Hammond-Kosack MC, Dobrinski B, Lurz R, Docherty K, Kilpatrick MW (1992) The human insulin gene linked polymorphic region exhibits an altered DNA structure. *Nucleic Acids Res* 20:231-236
- Hanahan D (1985) Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315:115-122

- Harper ME, Ullrich A, Saunders GF (1981) Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4458-4460
- Harrington RH, Sharma A (2001) Transcription factors recognizing overlapping C1-A2 binding sites positively regulate insulin gene expression. *J Biol Chem* 276:104-113
- Harrison KA, Thaler J, Pfaff SL, Gu H, Kehrl JH (1999) Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice. *Nat Genet* 23:71-75
- Hart AW, Baeza N, Apelqvist A, Edlund H (2000) Attenuation of FGF signalling in mouse beta-cells leads to diabetes. *Nature* 408:864-868
- Hebrok M, Kim SK, Melton DA (1998) Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* 12:1705-1713
- Heller RS, Stoffers DA, Bock T, Svenstrup K, Jensen J, Horn T, Miller CP, Habener JF, Madsen OD, Serup P (2001) Improved glucose tolerance and acinar dysmorphogenesis by targeted expression of transcription factor PDX-1 to the exocrine pancreas. *Diabetes* 50:1553-1561
- Herrera PL (2000) Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 127:2317-2322
- Hessabi B, Ziegler P, Schmidt I, Hessabi C, Walther R (1999) The nuclear localization signal (NLS) of PDX-1 is part of the homeodomain and represents a novel type of NLS. *Eur J Biochem* 263:170-177
- le Hir H, Nott A, Moore MJ (2003) How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci* 28:215-220
- Hodge DL MA, Julias JG, Taylor LS, Young HA (2002) Regulation of nuclear gamma interferon gene expression by interleukin 12 (IL-12) and IL-2 represents a novel form of posttranscriptional control. *Molecular and Cellular Biology* 22:1742-1753
- Holland PW (1999) Gene duplication: past, present and future. *Semin Cell Dev Biol* 10:541-547
- Holland PW, Garcia-Fernandez J, Williams NA, Sidow A (1994) Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Dev Suppl*:125-133
- Holland PW, Patton SJ, Brokke NM, Garcia-Fernández J (1997) Genetic patterning of ectoderm and endoderm in amphioxus: from homeobox genes to hormones. *XIII Inter Congress of Comparative Endocrinol* 16-21
- Holz GG LC (2001) Glucagon-like peptide-1: An insulinotropic hormone with potent growth factor actions at the pancreatic islets of Langerhans. *Molecular Basis of Pancreas Development and Function*:109-141
- Hoppener JW, Ahren B, Lips CJ (2000) Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 343:411-419
- Houle M, Sylvestre JR, Lohnes D (2003) Retinoic acid regulates a subset of Cdx1 function in vivo. *Development* 130:6555-6567
- Hsieh-Li HM, Witte DP, Szucsik JC, Weinstein M, Li H, Potter SS (1995) Gsh-2, a murine homeobox gene expressed in the developing brain. *Mech Dev* 50:177-186
- Hu Y, Kazenwadel J, James R (1993) Isolation and characterization of the murine homeobox gene Cdx-1. Regulation of expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 268:27214-27225

- Huang HP, Liu M, El-Hodiri HM, Chu K, Jamrich M, Tsai MJ (2000) Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol* 20:3292-3307
- Hui H, Perfetti R (2002) Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *Eur J Endocrinol* 146:129-141
- Hussain MA, Habener JF (2000) Glucagon-like peptide 1 increases glucose-dependent activity of the homeoprotein IDX-1 transactivating domain in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 274:616-619
- Hwung YP, Gu YZ, Tsai MJ (1990) Cooperativity of sequence elements mediates tissue specificity of the rat insulin II gene. *Mol Cell Biol* 10:1784-1788

I

- Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA (2003) In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 111:843-850
- IHGSC (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921
- Ikeya M, Takada S (2001) Wnt-3a is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of cdx-1 expression. *Mech Dev* 103:27-33
- Imhof A, Yang XJ, Ogryzko VV, Nakatani Y, Wolffe AP, Ge H (1997) Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol* 7:689-692
- Inada A, Someya Y, Yamada Y, Ihara Y, Kubota A, Ban N, Watanabe R, Tsuda K, Seino Y (1999) The cyclic AMP response element modulator family regulates the insulin gene transcription by interacting with transcription factor IID. *J Biol Chem* 274:21095-21103
- Inagaki N, Maekawa T, Sudo T, Ishii S, Seino Y, Imura H (1992) c-Jun represses the human insulin promoter activity that depends on multiple cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1045-1049
- Isaacs HV, Pownall ME, Slack JM (1998) Regulation of Hox gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue Xcad3. *Embo J* 17:3413-3427
- Itkin-Ansari P, Bain G, Beattie GM, Murre C, Hayek A, Levine F (1996) E2A gene products are not required for insulin gene expression. *Endocrinology* 137:3540-3543
- Itkin-Ansari P, Demeterco C, Bossie S, de la Tour DD, Beattie GM, Movassat J, Mally MI, Hayek A, Levine F (2000) PDX-1 and cell-cell contact act in synergy to promote delta-cell development in a human pancreatic endocrine precursor cell line. *Mol Endocrinol* 14:814-822
- Iwasaki N (2001) [Diabetes mellitus]. *Rinsho Byori* 49:161-164

J

- Jacquemin P, Durviaux SM, Jensen J, Godfraind C, Gradwohl G, Guillemot F, Madsen OD, Carmeliet P, Dewerchin M, Collen D, Rousseau GG, Lemaigre FP (2000) Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene ngn3. *Mol Cell Biol* 20:4445-4454

- Jacqueminet S, Briaud I, Rouault C, Reach G, Poitout V (2000) Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism* 49:532-536
- Jaikaran ET, Clark A (2001) Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 1537:179-203
- James R, Erler T, Kazenwadel J (1994) Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J Biol Chem* 269:15229-15237
- James R, Kazenwadel J (1991) Homeobox gene expression in the intestinal epithelium of adult mice. *J Biol Chem* 266:3246-3251
- Jang GD, Kim SW, Suh CW, Kim EK, Bahng HS, Jeong YH, Park IG, Kim WK, Kim SH, Suh EJ, Park CJ, Ji HS, Lee JS (2002) A case of treatment-related myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia following high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Korean Med Sci* 17:555-559
- Jensen J (2004) Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev Dyn* 229:176-200
- Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD, Serup P (2000) Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 49:163-176
- Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, Kageyama R, Guillemot F, Serup P, Madsen OD (2000) Control of endodermal endocrine development by *Hes-1*. *Nat Genet* 24:36-44
- Jin T, Drucker DJ (1996) Activation of proglucagon gene transcription through a novel promoter element by the caudal-related homeodomain protein *cdx-2/3*. *Mol Cell Biol* 16:19-28
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371:606-609
- Jorgensen MC, Vestergaard Petersen H, Ericson J, Madsen OD, Serup P (1999) Cloning and DNA-binding properties of the rat pancreatic beta-cell-specific factor *Nkx6.1*. *FEBS Lett* 461:287-294

K

- Kaiser N, Corcos AP, Sarel I, Cerasi E (1991) Monolayer culture of adult rat pancreatic islets on extracellular matrix: modulation of B-cell function by chronic exposure to high glucose. *Endocrinology* 129:2067-2076
- Kajimoto Y, Watada H, Matsuoka T, Kaneto H, Fujitani Y, Miyazaki J, Yamasaki Y (1997) Suppression of transcription factor *PDX-1/IPF1/STF-1/IDX-1* causes no decrease in insulin mRNA in MIN6 cells. *J Clin Invest* 100:1840-1846
- Karlsson O, Edlund T, Moss JB, Rutter WJ, Walker MD (1987) A mutational analysis of the insulin gene transcription control region: expression in beta cells is dependent on two related sequences within the enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8819-8823

- Karlsson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T (1990) Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 344:879-882
- Karlsson O, Walker MD, Rutter WJ, Edlund T (1989) Individual protein-binding domains of the insulin gene enhancer positively activate b-cell-specific transcription. *Mol Cell Biol* 9:823-827
- Kawaguchi Y CB, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV (2002) The role of transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature Genetics* 32:128-134
- Kennedy GC, Rutter WJ (1992) Pur-1, a zinc-finger protein that binds to purine-rich sequences, transactivates an insulin promoter in heterologous cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11498-11502
- Kessel M, Gruss P (1991) Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* 67:89-104
- Kieffer TJ, Habener JF (2000) The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E1-E14
- Kim KS HM (2001) Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes development* 15:111-127
- Kim SK, Selleri L, Lee JS, Zhang AY, Gu X, Jacobs Y, Cleary ML (2002) Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in *lpf1*-deficient mice promotes diabetes mellitus. *Nat Genet* 30:430-435
- Kim SY, Lee SH, Kim BM, Kim EH, Min BH, Bendayan M, Park IS (2004) Activation of nestin-positive duct stem (NPDS) cells in pancreas upon neogenic motivation and possible cytodifferentiation into insulin-secreting cells from NPDS cells. *Dev Dyn* 230:1-11
- Kodama S, Kuhlreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL (2003) Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science* 302:1223-1227
- Kondo T, Duboule D (1999) Breaking colinearity in the mouse HoxD complex. *Cell* 97:407-417
- Koranyi L, Permutt MA, Chirgwin JM, Giddings SJ (1989) Proinsulin I and II gene expression in inbred mouse strains. *Mol Endocrinol* 3:1895-1902
- Korsgren O, Jansson L, Sandler S, Andersson A (1990) Hyperglycemia-induced B cell toxicity. The fate of pancreatic islets transplanted into diabetic mice is dependent on their genetic background. *J Clin Invest* 86:2161-2168
- Krapp A, Knofler M, Frutiger S, Hughes GJ, Hagenbuchle O, Wellauer PK (1996) The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *Embo J* 15:4317-4329
- Krumlauf R (1994) Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78:191-201
- Kulkarni RN, Kahn CR (2004) Molecular biology. HNFs--linking the liver and pancreatic islets in diabetes. *Science* 303:1311-1312
- Kumar M, Melton D (2003) Pancreas specification: a budding question. *Curr Opin Genet Dev* 13:401-407

L

- Laimins L, Holmgren-Konig M, Khoury G (1986) Transcriptional "silencer" element in rat repetitive sequences associated with the rat insulin 1 gene locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3151-3155
- Lardon J, Rooman I, Bouwens L (2002) Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 117:535-540
- Laser B, Meda P, Constant I, Philippe J (1996) The caudal-related homeodomain protein Cdx-2/3 regulates glucagon gene expression in islet cells. *J Biol Chem* 271:28984-28994
- Lee JC, Smith SB, Watada H, Lin J, Scheel D, Wang J, Mirmira RG, German MS (2001) Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* 50:928-936
- Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H (1995) Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268:836-844
- Leibiger B, Wahlander K, Berggren PO, Leibiger IB (2000) Glucose-stimulated insulin biosynthesis depends on insulin-stimulated insulin gene transcription. *J Biol Chem* 275:30153-30156
- Leibowitz G, Ferber S, Apelqvist A, Edlund H, Gross DJ, Cerasi E, Melloul D, Kaiser N (2001) IPF1/PDX1 deficiency and beta-cell dysfunction in *Psammomys obesus*, an animal with type 2 diabetes. *Diabetes* 50:1799-1806
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585-595
- Leo C, Chen JD (2000) The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245:1-11
- Leonard J, Peers B, Johnson T, Ferreri K, Lee S, Montminy MR (1993) Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol Endocrinol* 7:1275-1283
- Leonard J, Serup P, Gonzalez G, Edlund T, Montminy M (1992) The LIM family transcription factor Isl-1 requires cAMP response element binding protein to promote somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6247-6251
- Levine M, Harding K, Wedeen C, Doyle H, Hoey T, Radomska H (1985) Expression of the homeobox gene family in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 50:209-222
- Lewis EB (1994) Homeosis: the first 100 years. *Trends Genet* 10:341-343
- Lewis EB (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276:565-570
- Li H, Arber S, Jessell TM, Edlund H (1999) Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Genet* 23:67-70
- Li H, Schrick JJ, Fewell GD, MacFarland KL, Witte DP, Bodenmiller DM, Hsieh-Li HM, Su CY, Potter SS (1999) Novel strategy yields candidate Gsh-1 homeobox gene targets using hypothalamus progenitor cell lines. *Dev Biol* 211:64-76
- Li H, Zeitler PS, Valerius MT, Small K, Potter SS (1996) Gsh-1, an orphan Hox gene, is required for normal pituitary development. *Embo J* 15:714-724
- Lickert H, Kemler R (2002) Functional analysis of cis-regulatory elements controlling initiation and maintenance of early Cdx1 gene expression in the mouse. *Dev Dyn* 225:216-220

- Lipsett M, Finegood DT (2002) beta-cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats. *Diabetes* 51:1834-1841
- Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C (1998) Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* 20:58-61
- Liu Y, MacDonald RJ, Swift GH (2001) DNA binding and transcriptional activation by a PDX1.PBX1b.MEIS2b trimer and cooperation with a pancreas-specific basic helix-loop-helix complex. *J Biol Chem* 276:17985-17993
- Lohnes D (2003) The Cdx1 homeodomain protein: an integrator of posterior signaling in the mouse. *Bioessays* 25:971-980
- Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN (1997) Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* 139:1553-1565
- Lu M MC, Habener JF. (1996) Functional regions of the homeodomain protein PDX-1 required for transactivation of the rat somatostatin gene. *Endocrinology* 137:2959-2967
- Lu M, Seufert J, Habener JF (1997) Pancreatic beta-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/enhancer-binding protein beta. Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47. *J Biol Chem* 272:28349-28359
- Lynch M, Conery JS (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290:1151-1155

M

- Macfarlane WM, Cragg H, Docherty HM, Read ML, James RF, Aynsley-Green A, Docherty K (1997) Impaired expression of transcription factor IUF1 in a pancreatic beta-cell line derived from a patient with persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy (nesidioblastosis). *FEBS Lett* 413:304-308
- Macfarlane WM, McKinnon CM, Felton-Edkins ZA, Cragg H, James RF, Docherty K (1999) Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 274:1011-1016
- Macfarlane WM, Read ML, Gilligan M, Bujalska I, Docherty K (1994) Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner. *Biochem J* 303 (Pt 2):625-631
- Macfarlane WM, Shepherd RM, Cosgrove KE, James RF, Dunne MJ, Docherty K (2000) Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent on transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular Ca²⁺. *Diabetes* 49:418-423
- Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M, Krolewski AS (1999) Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 23:323-328
- Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M, Jordan BR, Dusetti NJ, Dagorn JC, Iovanna JL (1997) Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA

- encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer* 74:35-44
- Marshak S, Benshushan E, Shoshkes M, Havin L, Cerasi E, Melloul D (2000) Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol* 20:7583-7590
- Marshak S, Leibowitz G, Bertuzzi F, Socci C, Kaiser N, Gross DJ, Cerasi E, Melloul D (1999) Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes* 48:1230-1236
- Marshak S, Totary H, Cerasi E, Melloul D (1996) Purification of the beta-cell glucose-sensitive factor that transactivates the insulin gene differentially in normal and transformed islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15057-15062
- Massari ME, Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20:429-440
- Matsuoka M, Osada T, Yoshida-Matsuoka J, Ikai A, Ichikawa M, Norita M, Costanzo RM (2002) A comparative immunocytochemical study of development and regeneration of chemosensory neurons in the rat vomeronasal system. *Brain Res* 946:52-63
- Matsuoka T, Kajimoto Y, Watada H, Kaneto H, Kishimoto M, Umayahara Y, Fujitani Y, Kamada T, Kawamori R, Yamasaki Y (1997) Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *J Clin Invest* 99:144-150
- Matsuoka T, Zhao L, Stein R (2001) The DNA binding activity of the RIPE3b1 transcription factor of insulin appears to be influenced by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 276:22071-22076
- Maulbecker CC, Gruss P (1993) The oncogenic potential of deregulated homeobox genes. *Cell Growth Differ* 4:431-441
- McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ (1984) A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37:403-408
- McKinnon CM, Docherty K (2001) Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* 44:1203-1214
- McLysaght A, Hokamp K, Wolfe KH (2002) Extensive genomic duplication during early chordate evolution. *Nat Genet* 31:200-204
- Melloul D, Ben-Neriah Y, Cerasi E (1993) Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3865-3869
- Melloul D, Marshak S, Cerasi E (2002) Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45:309-326
- Mendel DB, Hansen LP, Graves MK, Conley PB, Crabtree GR (1991) HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Genes Dev* 5:1042-1056
- Meyer BI, Gruss P (1993) Mouse Cdx-1 expression during gastrulation. *Development* 117:191-203

- Miettinen PJ, Huotari M, Koivisto T, Ustinov J, Palgi J, Rasilainen S, Lehtonen E, Keski-Oja J, Otonkoski T (2000) Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development* 127:2617-2627
- Milewski WM, Duguay SJ, Chan SJ, Steiner DF (1998) Conservation of PDX-1 structure, function, and expression in zebrafish. *Endocrinology* 139:1440-1449
- Miller CP, McGehee RE, Jr., Habener JF (1994) IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *Embo J* 13:1145-1156
- Minguillon C, Garcia-Fernandez J (2003) Genesis and evolution of the Evx and Mox genes and the extended Hox and ParaHox gene clusters. *Genome Biol* 4:R12
- Miralles F, Battelino T, Czernichow P, Scharfmann R (1998) TGF-beta plays a key role in morphogenesis of the pancreatic islets of Langerhans by controlling the activity of the matrix metalloproteinase MMP-2. *J Cell Biol* 143:827-836
- Mlodzik M, Gehring WJ (1987) Expression of the caudal gene in the germ line of Drosophila: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. *Cell* 48:465-478
- Moates JM, Nanda S, Cissell MA, Tsai MJ, Stein R (2003) BETA2 activates transcription from the upstream glucokinase gene promoter in islet beta-cells and gut endocrine cells. *Diabetes* 52:403-408
- Moede T, Leibiger B, Pour HG, Berggren P, Leibiger IB (1999) Identification of a nuclear localization signal, RRMKWKK, in the homeodomain transcription factor PDX-1. *FEBS Lett* 461:229-234
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071-1082
- Murakami T, Fujita T, Miyake T, Ohtsuka A, Taguchi T, Kikuta A (1993) The insulo-acinar portal and insulo-venous drainage systems in the pancreas of the mouse, dog, monkey and certain other animals: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Arch Histol Cytol* 56:127-147
- Murtaugh LC, Melton DA (2003) Genes, signals and lineages in pancreas development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:71-89

N

- Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ (1997) Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11:2323-2334
- Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai MJ (1995) Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* 9:1009-1019
- Nielsen DA, Welsh M, Casadaban MJ, Steiner DF (1985) Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA. *J Biol Chem* 260:13585-13589

Nielsen JH, Galsgaard ED, Moldrup A, Friedrichsen BN, Billestrup N, Hansen JA, Lee YC, Carlsson C (2001) Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes* 50 Suppl 1:S25-29

Nieuwkoop PD (1999) The neural induction process; its morphogenetic aspects. *Int J Dev Biol* 43:615-623

O

Odagiri H, Wang J, German MS (1996) Function of the human insulin promoter in primary cultured islet cells. *J Biol Chem* 271:1909-1915

Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, Young RA (2004) Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303:1378-1381

Oh SH, Hatch HM, Petersen BE (2002) Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 13:405-409

Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T (1993) IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J* 12:4251-4259

Ohneda K, Mirmira RG, Wang J, Johnson JD, German MS (2000) The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol Cell Biol* 20:900-911

Ohno S (1970) *Evolution by gene duplication*. London

P

Patel YC (1999) Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 20:157-198

Peers B, Leonard J, Sharma S, Teitelman G, Montminy MR (1994) Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol Endocrinol* 8:1798-1806

Peers B, Sharma S, Johnson T, Kamps M, Montminy M (1995) The pancreatic islet factor STF-1 binds cooperatively with Pbx to a regulatory element in the somatostatin promoter: importance of the FPWMK motif and of the homeodomain. *Mol Cell Biol* 15:7091-7097

Perfetti R, Zhou J, Doyle ME, Egan JM (2000) Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology* 141:4600-4605

Permutt MA, Kipnis DM (1972) Insulin biosynthesis. I. On the mechanism of glucose stimulation. *J Biol Chem* 247:1194-1199

Peshavaria M, Henderson E, Sharma A, Wright CV, Stein R (1997) Functional characterization of the transactivation properties of the PDX-1 homeodomain protein. *Mol Cell Biol* 17:3987-3996

Petersen HV, Peshavaria M, Pedersen AA, Philippe J, Stein R, Madsen OD, Serup P (1998) Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett* 431:362-366

- Petersen HV, Serup P, Leonard J, Michelsen BK, Madsen OD (1994) Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10465-10469
- Peyton M, Stellrecht CM, Naya FJ, Huang HP, Samora PJ, Tsai MJ (1996) BETA3, a novel helix-loop-helix protein, can act as a negative regulator of BETA2 and MyoD-responsive genes. *Mol Cell Biol* 16:626-633
- Pin CL, Rukstalis JM, Johnson C, Konieczny SF (2001) The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *J Cell Biol* 155:519-530
- Poitout V, Olson LK, Robertson RP (1996) Chronic exposure of betaTC-6 cells to supraphysiologic concentrations of glucose decreases binding of the RIPE3b1 insulin gene transcription activator. *J Clin Invest* 97:1041-1046
- Polak M, Bouchareb-Banaei L, Scharfmann R, Czernichow P (2000) Early pattern of differentiation in the human pancreas. *Diabetes* 49:225-232
- Pollard SL, Holland PWH (2000) Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry. *Current Biol* 10: 1059-1062
- Pontoglio M, Sreenan S, Roe M, Pugh W, Ostrega D, Doyen A, Pick AJ, Baldwin A, Velho G, Froguel P, Levisetti M, Bonner-Weir S, Bell GI, Yaniv M, Polonsky KS (1998) Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *J Clin Invest* 101:2215-2222
- Pownall ME, Tucker AS, Slack JM, Isaacs HV (1996) eFGF, Xcad3 and Hox genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*. *Development* 122:3881-3892
- Prinos P, Joseph S, Oh K, Meyer BI, Gruss P, Lohnes D (2001) Multiple pathways governing Cdx1 expression during murine development. *Dev Biol* 239:257-269

Q

- Qian J, Kaytor EN, Towle HC, Olson LK (1999) Upstream stimulatory factor regulates Pdx-1 gene expression in differentiated pancreatic beta-cells. *Biochem J* 341 (Pt 2):315-322
- Qiu Y, Guo M, Huang S, Stein R (2002) Insulin gene transcription is mediated by interactions between the p300 coactivator and PDX-1, BETA2, and E47. *Mol Cell Biol* 22:412-420

R

- Rafiq I, Kennedy HJ, Rutter GA (1998) Glucose-dependent translocation of insulin promoter factor-1 (IPF-1) between the nuclear periphery and the nucleoplasm of single MIN6 beta-cells. *J Biol Chem* 273:23241-23247
- Read ML, Masson MR, Docherty K (1997) A RIPE3b1-like factor binds to a novel site in the human insulin promoter in a redox-dependent manner. *FEBS Lett* 418:68-72
- Ritz-Laser B, Estreicher A, Klages N, Saule S, Philippe J (1999) Pax-6 and Cdx-2/3 interact to activate glucagon gene expression on the G1 control element. *J Biol Chem* 274:4124-4132

- Ritz-Laser B, Gauthier BR, Estreicher A, Mamin A, Brun T, Ris F, Salmon P, Halban PA, Trono D, Philippe J (2003) Ectopic expression of the beta-cell specific transcription factor Pdx1 inhibits glucagon gene transcription. *Diabetologia* 46:810-821
- Robinson GL, Henderson E, Massari ME, Murre C, Stein R (1995) c-jun inhibits insulin control element-mediated transcription by affecting the transactivation potential of the E2A gene products. *Mol Cell Biol* 15:1398-1404
- Rose SD, Swift GH, Peyton MJ, Hammer RE, MacDonald RJ (2001) The role of PTF1-P48 in pancreatic acinar gene expression. *J Biol Chem* 276:44018-44026
- Rossant J, Zirngibl R, Cado D, Shago M, Giguere V (1991) Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 5:1333-1344
- Roy S, Qiao T, Wolff C, Ingham PW (2001) Hedgehog signaling pathway is essential for pancreas specification in the zebrafish embryo. *Curr Biol* 11:1358-1363
- Rudnick A, Ling TY, Odagiri H, Rutter WJ, German MS (1994) Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12203-12207
- Rutter GA (1999) Insulin secretion: feed-forward control of insulin biosynthesis? *Curr Biol* 9:R443-445
- Ruvolo V, Gupta AK, Swaminathan S (2001) Epstein-Barr virus SM protein interacts with mRNA in vivo and mediates a gene-specific increase in cytoplasmic mRNA. *J Virol* 75:6033-6041

S

- Sako Y, Grill VE (1990) Coupling of beta-cell desensitization by hyperglycemia to excessive stimulation and circulating insulin in glucose-infused rats. *Diabetes* 39:1580-1583
- Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S (2002) Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45:85-96
- Sander M, Griffen SC, Huang J, German MS (1998) A Novel glucose-responsive element in the human insulin gene functions uniquely in primary cultured islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11572-11577
- Sander M, Neubuser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS (1997) Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 11:1662-1673
- Sander M, Sussel L, Connors J, Scheel D, Kalamaras J, Dela Cruz F, Schwitzgebel V, Hayes-Jordan A, German M (2000) Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 127:5533-5540
- Sanvito F, Herrera PL, Huarte J, Nichols A, Montesano R, Orci L, Vassalli JD (1994) TGF- β 1 influences the relative development of the exocrine and endocrine pancreas in vitro. *Development* 120:3451-3462
- Sasai Y, De Robertis EM (1997) Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev Biol* 182:5-20

- Schmidtke J, Weiler C, Kunz B, Engel W (1977) Isozymes of a tunicate and a cephalochordate as a test of polyploidisation in chordate evolution. *Nature* 266:532-533
- Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG (2001) Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 50:1-11
- Schwartz PT, Perez-Villamil B, Rivera A, Moratalla R, Vallejo M (2000) Pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 expressed in developing brain regulates somatostatin gene transcription in embryonic neural cells. *J Biol Chem* 275:19106-19114
- Schwitzgebel VM, Scheel DW, Conners JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS (2000) Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127:3533-3542
- Scott MP, Weiner AJ (1984) Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4115-4119
- Seijffers R, Ben-David O, Cohen Y, Karasik A, Berezin M, Newgard CB, Ferber S (1999) Increase in PDX-1 levels suppresses insulin gene expression in RIN 1046-38 cells. *Endocrinology* 140:3311-3317
- Selander L, Edlund H (2002) Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas. *Mech Dev* 113:189-192
- Serup P, Jensen J, Andersen FG, Jorgensen MC, Blume N, Holst JJ, Madsen OD (1996) Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9015-9020
- Serup P, Petersen HV, Pedersen EE, Edlund H, Leonard J, Petersen JS, Larsson LI, Madsen OD (1995) The homeodomain protein IPF-1/STF-1 is expressed in a subset of islet cells and promotes rat insulin 1 gene expression dependent on an intact E1 helix-loop-helix factor binding site. *Biochem J* 310 (Pt 3):997-1003
- Sharma A, Fusco-DeMane D, Henderson E, Efrat S, Stein R (1995) The role of the insulin control element and RIPE3b1 activators in glucose-stimulated transcription of the insulin gene. *Mol Endocrinol* 9:1468-1476
- Sharma A, Olson LK, Robertson RP, Stein R (1995) The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression. *Mol Endocrinol* 9:1127-1134
- Sharma A, Stein R (1994) Glucose-induced transcription of the insulin gene is mediated by factors required for beta-cell-type-specific expression. *Mol Cell Biol* 14:871-879
- Sharma A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, Bonner-Weir S (1999) The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* 48:507-513
- Sharma S, Jhala US, Johnson T, Ferreri K, Leonard J, Montminy M (1997) Hormonal regulation of an islet-specific enhancer in the pancreatic homeobox gene STF-1. *Mol Cell Biol* 17:2598-2604

- Sharma S, Leonard J, Lee S, Chapman HD, Leiter EH, Montminy MR (1996) Pancreatic islet expression of the homeobox factor STF-1 relies on an E-box motif that binds USF. *J Biol Chem* 271:2294-2299
- Sharman AC, Holland PWH (1996) Conservation, duplication and divergence of developmental genes during chordate evolution. *Neth J Zool* 46:47-67
- Shibuya S, Miyamoto O, Auer RN, Itano T, Mori S, Norimatsu H (2002) Embryonic intermediate filament, nestin, expression following traumatic spinal cord injury in adult rats. *Neuroscience* 114:905-916
- Shieh SY, Tsai MJ (1991) Cell-specific and ubiquitous factors are responsible for the enhancer activity of the rat insulin II gene. *J Biol Chem* 266:16708-16714
- Shim EY, Woodcock C, Zaret KS (1998) Nucleosome positioning by the winged helix transcription factor HNF3. *Genes Dev* 12:5-10
- Shushan EB, Cerasi E, Melloul D (1999) Regulation of the insulin gene by glucose: stimulation of trans-activation potency of human PDX-1 N-terminal domain. *DNA Cell Biol* 18:471-479
- Silberg DG, Furth EE, Taylor JK, Schuck T, Chiou T, Traber PG (1997) CDX1 protein expression in normal, metaplastic, and neoplastic human alimentary tract epithelium. *Gastroenterology* 113:478-486
- Skoglund G, Hussain MA, Holz GG (2000) Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene promoter activity by protein kinase A-independent activation of the rat insulin I gene cAMP response element. *Diabetes* 49:1156-1164
- Slack JM (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development* 121:1569-1580
- Smith SB, Ee HC, Connors JR, German MS (1999) Paired-homeodomain transcription factor PAX4 acts as a transcriptional repressor in early pancreatic development. *Mol Cell Biol* 19:8272-8280
- Soares MB, Ishii DN, Efstratiadis A (1985) Developmental and tissue-specific expression of a family of transcripts related to rat insulin-like growth factor II mRNA. *Nucleic Acids Res* 13:1119-1134
- Sorenson RL, Brelje TC (1997) Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 29:301-307
- Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P (1997) The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386:399-402
- Spooner BS, Walther BT, Rutter WJ (1970) The development of the dorsal and ventral mammalian pancreas in vivo and in vitro. *J Cell Biol* 47:235-246
- Spring J (2002) Genome duplication strikes back. *Nat Genet* 31:128-129
- St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P (1997) Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 387:406-409
- St-Onge L, Wehr R, Gruss P (1999) Pancreas development and diabetes. *Curr Opin Genet Dev* 9:295-300

- Steiner DF, Chan SJ, Welsh JM, Kwok SC (1985) Structure and evolution of the insulin gene. *Annu Rev Genet* 19:463-484
- Stoffel M, Stein R, Wright CV, Espinosa R, 3rd, Le Beau MM, Bell GI (1995) Localization of human homeodomain transcription factor insulin promoter factor 1 (IPF1) to chromosome band 13q12.1. *Genomics* 28:125-126
- Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF (1997) Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17:138-139
- Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF (1997) Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human *IPF1* gene coding sequence. *Nature Genet* 15: 106-110
- Stoffers DA, Heller RS, Miller CP, Habener JF (1999) Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter. *Endocrinology* 140:5374-5381
- Stoffers DA, Stanojevic V, Habener JF (1998) Insulin promoter factor-1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein. *J Clin Invest* 102:232-241
- Subramanian V, Meyer BI, Gruss P (1995) Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell* 83:641-653
- Suh E, Traber PG (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 16:619-625
- Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, German MS (1998) Mice lacking the homeodomain transcription factor *Nkx2.2* have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* 125:2213-2221
- Swift GH, Liu Y, Rose SD, Bischof LJ, Steelman S, Buchberg AM, Wright CV, MacDonald RJ (1998) An endocrine-exocrine switch in the activity of the pancreatic homeodomain protein PDX1 through formation of a trimeric complex with PBX1b and MRG1 (MEIS2). *Mol Cell Biol* 18:5109-5120

T

- Thomas MK, Devon ON, Lee JH, Peter A, Schlosser DA, Tenser MS, Habener JF (2001) Development of diabetes mellitus in aging transgenic mice following suppression of pancreatic homeoprotein IDX-1. *J Clin Invest* 108:319-329
- Thomas MK, Rastalsky N, Lee JH, Habener JF (2000) Hedgehog signaling regulation of insulin production by pancreatic beta-cells. *Diabetes* 49:2039-2047
- Thomas MK, Yao KM, Tenser MS, Wong GG, Habener JF (1999) Bridge-1, a novel PDZ-domain coactivator of E2A-mediated regulation of insulin gene transcription. *Mol Cell Biol* 19:8492-8504
- Toresson H, Campbell K (2001) A role for *Gsh1* in the developing striatum and olfactory bulb of *Gsh2* mutant mice. *Development* 128:4769-4780

Trainor PA, Krumlauf R (2001) Hox genes, neural crest cells and branchial arch patterning. *Curr Opin Cell Biol* 13:698-705

V

Valerius MT, Li H, Stock JL, Weinstein M, Kaur S, Singh G, Potter SS (1995) Gsh-1: a novel murine homeobox gene expressed in the central nervous system. *Dev Dyn* 203:337-351

Van den Akker E, Forlani S, Chawengsaksophak K, de Graaff W, Beck F, Meyer BI, Deschamps J (2002) Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* 129:2181-2193

Van der Hoeven F, Zakany J, Duboule D (1996) Gene transpositions in the HoxD complex reveal a hierarchy of regulatory controls. *Cell* 85:1025-1035

Venter JC, et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351

W

Wada H, Garcia-Fernandez J, Holland PW (1999) Colinear and segmental expression of amphioxus Hox genes. *Dev Biol* 213:131-141

Wang H, Maechler P, Ritz-Laser B, Hagenfeldt KA, Ishihara H, Philippe J, Wollheim CB (2001) Pdx1 level defines pancreatic gene expression pattern and cell lineage differentiation. *J Biol Chem* 276:25279-25286

Watada G MR (2000) transcriptional and translational regulation of beta-cell differentiation factor Nkx6.1. *J Biol Chem* 275:34224-34230

Watada H, Kajimoto Y, Kaneto H, Matsuoka T, Fujitani Y, Miyazaki J, Yamasaki Y (1996) Involvement of the homeodomain-containing transcription factor PDX-1 in islet amyloid polypeptide gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 229:746-751

Watada H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Hanafusa T, Hamaguchi K, Matsuoka T, Yamamoto K, Matsuzawa Y, Kawamori R, Yamasaki Y (1996) PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in alphaTC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. *Diabetes* 45:1826-1831

Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, Hoodless P, Prezioso VR, Jessell TM, Darnell JE, Jr. (1994) The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 78:575-588

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:387-403

Wells JM, Melton DA (2000) Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 127:1563-1572

Welsh N, Hellerstrom C (1990) In vitro restoration of insulin production in islets from adult rats treated neonatally with streptozotocin. *Endocrinology* 126:1842-1848

Westermarck P, Wilander E (1978) The influence of amyloid deposits on the islet volume in maturity onset diabetes mellitus. *Diabetologia* 15:417-421

- Whelan J, Poon D, Weil PA, Stein R (1989) Pancreatic beta-cell-type-specific expression of the rat insulin II gene is controlled by positive and negative cellular transcriptional elements. *Mol Cell Biol* 9:3253-3259
- Wice BM, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA (2001) Glucose and other insulin secretagogues induce, rather than inhibit, expression of Id-1 and Id-3 in pancreatic islet beta cells. *Diabetologia* 44:453-463
- Wilson ME, Kalamaras JA, German MS (2002) Expression pattern of IAPP and prohormone convertase 1/3 reveals a distinctive set of endocrine cells in the embryonic pancreas. *Mech Dev* 115:171-176
- Wu KL, Gannon M, Peshavaria M, Offield MF, Henderson E, Ray M, Marks A, Gamer LW, Wright CV, Stein R (1997) Hepatocyte nuclear factor 3beta is involved in pancreatic beta-cell-specific transcription of the pdx-1 gene. *Mol Cell Biol* 17:6002-6013

Y

- Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Bell GI, et al. (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384:455-458
- Yokoi N, Serikawa T, Walther R (1997) Pdx1, a homeodomain transcription factor required for pancreas development, maps to rat chromosome 12. *Exp Anim* 46:323-324

Z

- Zajicek G, Arber N, Schwartz-Arad D, Ariel I (1990) Streaming pancreas: islet cell kinetics. *Diabetes Res* 13:121-125
- Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF (2001) Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50:521-533