

Tesis de Posgrado

Especificidad tisular de la expresión de genes Eucariotas en ratones transgénicos : 1) 3,8 kilobases del promotor de beta-caseína bovino dirigen la expresión de proteínas recombinantes a la glándula mamaria y 2) expresión específica del gen de proopiomelanocortina en el sistema nervioso central

Cerdán, Marcelo Guido

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cerdán, Marcelo Guido. (1999). Especificidad tisular de la expresión de genes Eucariotas en ratones transgénicos : 1) 3,8 kilobases del promotor de beta-caseína bovino dirigen la expresión de proteínas recombinantes a la glándula mamaria y 2) expresión específica del gen de proopiomelanocortina en el sistema nervioso central. Facultad de Ciencias Exactas y

Cita tipo Chicago:

Cerdán, Marcelo Guido. "Especificidad tisular de la expresión de genes Eucariotas en ratones transgénicos : 1) 3,8 kilobases del promotor de beta-caseína bovino dirigen la expresión de proteínas recombinantes a la glándula mamaria y 2) expresión específica del gen de proopiomelanocortina en el sistema nervioso central". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3150_Cerdan.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES**



**ESPECIFICIDAD TISULAR DE LA EXPRESIÓN DE GENES
EUCARIOTAS EN RATONES TRANSGÉNICOS: 1) 3,8
KILOBASES DEL PROMOTOR DE β -CASEÍNA BOVINO DIRIGEN
LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES A LA
GLÁNDULA MAMARIA Y 2) EXPRESIÓN ESPECÍFICA DEL GEN
DE PROOPIOMELANOCORTINA EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL**

*Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y
Biología Molecular, perteneciente al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas de
la República Argentina.*

**TESIS DOCTORAL
MARCELO GUIDO CERDÁN**

3150

1999

RESUMEN: TESIS DOCTORAL

Especificidad Tisular de la Expresión de Genes Eucariotas en Ratones Transgénicos: 1) 3,8 kilobases del Promotor de β -caseína Bovino Dirigen la Expresión de Proteínas Recombinantes a la Glándula Mamaria y 2) Expresión Específica del Gen de Proopiomelanocortina en el Sistema Nervioso Central

Marcelo Guido Cerdán

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Durante este trabajo se estudio la regulación tejido específica de dos genes mediante la utilización de ratones transgénicos.

1) Se estudió con que eficacia un fragmento de 3,8 kb del promotor bovino de β -caseína puede dirigir una expresión tejido específica a la glándula mamaria. El patrón de expresión espacial, temporal y hormonal del gen de fusión, resultó altamente regulado y confinado estrictamente a células epiteliales de la glándula mamaria lactante. En estudios previos realizados sobre una línea celular de glándula mamaria de ratón, se había demostrado que con 1,7 kb del promotor bovino de β -caseína era posible obtener expresión celular específica, a su vez regulada hormonalmente. Esta misma construcción no funcionó al intentar dirigir la expresión específica a glándula mamaria de ratones transgénicos. En este trabajo utilizamos un promotor de mayor tamaño del mismo gen, 3,8 kb, para direccionar la expresión del gen de la hormona de crecimiento humana (hGH) a glándula mamaria de ratones transgénicos. Por medio de un ensayo de *Northern blot* se determinó la presencia de ARNm de hGH únicamente en glándula mamaria de hembras en periodo de lactancia. Este ARNm no se detectó en glándula mamaria de hembras vírgenes. Un análisis durante el desarrollo de la glándula mamaria demostró que el transgén sigue un patrón de expresión que se asemeja mucho más al bovino que al murino. En estudios de hibridación *in situ*, realizados sobre secciones de glándula mamaria, se observó que el patrón de expresión del transgén resultó homogéneo en todos los lóbulos, tanto en animales heterocigotas como homocigotas. La cantidad de granos de plata contados sobre tejido mamario se correlacionó altamente con el contenido de hGH en leche, previamente determinado por radioinmunoensayo ($r=0.996$). Por lo tanto, las 3,8 kb del promotor bovino de β -caseína pueden direccionar altos niveles de expresión de proteínas terapéuticas a la glándula mamaria de ratones transgénicos con especificidad celular y regulación correcta durante el desarrollo.

2) Se evaluó la expresión celular específica del gen de Pro-Opiomelanocortin (POMC) en neuronas. El gen de POMC se expresa en una serie de neuronas del hipotálamo y tracto solitario, y en corticotrofos y melanotrofos hipofisarios. En estudios previos se determinó que una porción proximal del promotor de POMC de rata o ratón era suficiente para dirigir expresión celular-específica, regulada hormonalmente y en forma correcta durante el desarrollo, a melanotrofos y corticotrofos, pero no a neuronas. Más recientemente se identificó la presencia de posibles activadores de la transcripción dentro de una zona de 11 kb en la región 5'flanqueante del gen de POMC (entre -13 kb y -2 kb). En el presente trabajo, por medio de un análisis delecional se ubicó el elemento neuronal específico a una resolución de 4 kb. Se generaron 3 construcciones conteniendo secuencias genómicas de POMC (6 kb de la unidad transcripcional y 2 kb de la región 3'flanqueante) con diferentes longitudes de la región 5'flanqueante, 13 kb (-13/+8POMC-EGFP), 9 kb (-9/+8POMC-EGFP) y 5 kb (-5/+8POMC-EGFP). A estas secuencias se les introdujo en el exón 2, previo al sitio ATG, una versión mamiferizada de la proteína verde fluorescente de medusa (EGFP). Esta innovación permitió visualizar la expresión transgénica en el cerebro e hipófisis en forma inmediata luego de realizar los cortes de los tejidos. En tres de un total de cuatro líneas de animales transgénicos generados para las construcciones -5/+8POMC-EGFP y -9/+8POMC-EGFP se observó fluorescencia en corticotropos y melanotropos. Estos transgenes se expresaron en neuronas. Contrariamente, la construcción -13/+8POMC-EGFP se expresó correctamente en hipófisis y neuronas de POMC. Este resultado nos sugiere que la presencia del elemento neuronal específico buscado se encuentra entre -9 y -13kb del inicio de la transcripción. En experimentos futuros, nuestro objetivo será clonar e identificar el factor de transcripción neuronal que interactúa con los elementos *cis*. Nosotros proponemos inmortalizar un línea celular neuronal que exprese POMC mediante oncogénesis dirigida en ratones transgénicos. Hemos generado 4 líneas de ratones transgénicos con una construcción similar a -13/+8POMC-EGFP, pero conteniendo una versión termo-sensible del antígeno T largo (AgT-tsA58) insertada en el segundo exón del gen de POMC de ratón. En estas 4 líneas se desarrollaron

tumores prematuramente en la región hipofisaria-hipotalámica, a pesar de que la temperatura corporal del ratón es no permisiva. Tres de estos ratones murieron antes de reproducirse. Sólo una hembra pudo ser mantenida con un programa de apareamientos utilizando machos jóvenes. En estudio realizado con un *Northern blot* se observó una expresión considerable de POMC en esos tumores, En próximos experimentos evaluaremos la presencia de marcadores neuronales e hipofisarios para determinar la naturaleza de dichos tumores.

Abstract: Doctoral Thesis

Tissue specific expression of eucaryotic genes in transgenic mice: 1) 3.8 kilobases of the bovine β -casein gene direct the expression of recombinant proteins to mammary gland and 2) Tissue-specific expression of the pro-opiomelanocortin gene in the Central Nervous System

Marcelo Guido Cerdán

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

During this study the tissue specific regulation of two different promoter genes were studied using transgenic mice.

1) The ability of a 3.8-kilobase promoter of the bovine β -casein gene to drive cell specific expression to the mammary gland was evaluated in transgenic mice. The spatial, temporal, and hormonal pattern of expression of the fusion gene is highly regulated and confined to the epithelial cells of the lactating mammary gland. Previous studies have shown that 1.7 kb of the bovine β -casein promoter were able to drive cell-specific and hormone-dependent expression in a mouse mammary cell line but failed to induce accurate expression to the mammary gland of transgenic mice. We investigated here the ability of a larger sequence consisting of 3.8 kb of the bovine β -casein gene promoter to drive the expression of the human growth hormone (hGH) gene in transgenic mice. A Northern blot analysis using total RNA obtained from different tissues of lactating and non lactating females revealed the presence of hGH mRNA only in the mammary gland of lactating females. hGH mRNA was not detectable in the mammary gland of virgin females. A developmental analysis showed that hGH mRNA only peaked on parturition, resembling more closely the bovine β -casein temporal expression pattern rather than the murine. In situ hybridization studies performed on mammary gland sections showed that the cellular pattern of hGH expression was homogeneous in all lobules from heterozygous and homozygous transgenic mice. Silver grain counts on the tissue sections highly correlated with the hGH contents in the milk determined by radioimmunoassay ($r = 0.996$). Thus 3.8 kb of the bovine β -casein promoter direct a high-level expression of therapeutic genes to the lactating mammary gland of transgenic mice in a tissue-specific and developmentally regulated manner.

2) The cell-specific expression of the Pro-Opiomelanocortin (POMC) gene in hypothalamic neurons was evaluated in transgenic mice. The POMC gene is expressed in a subset of hypothalamic and hindbrain neurons and in pituitary melanotrophs and corticotrophs. Previous studies demonstrated that the presence of a proximal promoter of the rat or mouse POMC gene was sufficient to drive cell-specific, developmentally and hormonally regulated expression in melanotrophs and corticotrophs of transgenic mice, but not in neurons. More recently we identified the presence of a putative neuron-specific enhancer/s within 11 kb of 5' flanking sequences of the mouse POMC gene (-13 kb to -2 kb). In the present work, by using a deletional analysis in transgenic mice we localised this site/s within a 4 kb resolution. Three different constructs were generated containing genomic sequences of the POMC gene (6 kb of the transcription unit and 2 kb of the 3' flanking region) with different lengths of the 5' flanking region, 13 kb (-13/+8POMC-EGFP), 9 kb (-9/+8POMC-EGFP) and 5 kb (-5/+8POMC-EGFP). We also introduced in the exon 2 of the POMC gene, previous to the ATG site, a "mammalianized" version of the green fluorescent protein (EGFP). This innovation allowed us to visualise transgenic expression in the brain and the pituitary immediately after tissue sectioning. Three out of four lines of transgenic mice generated with each of the constructs, -9/+8POMC-EGFP and -5/+8POMC-EGFP showed green fluorescence in pituitary melanotrophs and corticotrophs. These transgenes failed to direct expression of EGFP to POMC neurons. However, the construct -13/+8POMC-EGFP showed correct expression in pituitary and hypothalamic neurons, suggesting that a specific neurone element is located between -9 kb and -13 kb from the transcription initiation point. In future experiments our goal is to clone and identify the neuronal transcription factor that interacts with the cis-acting elements. We propose to immortalise neuronal cell lines expressing POMC by targeted oncogenesis in transgenic mice. We have generated 4 transgenic mouse lines with a construct similar to the -13/+8POMC-EGFP, but containing the temperature sensitive version of the oncogenic large T antigen (tsA58-Tag) inserted into the second exon of the mouse POMC gene. These four lines showed premature tumors in the pituitary-hypothalamic region despite the non-permissive temperature of the mouse body. Three of these mice died before breeding. Only one line could be maintained by mating young males. Interestingly, Northern blots experiments showed high POMC expression in these tumors. In further experiments we are going to evaluate the presence of neuronal and pituitary markers to establish the nature of these tumors.

INTRODUCCION

La diferenciación celular es un proceso regulado por la expresión diferencial de distintos genes. La expresión célula-específica de estos genes depende de la interacción entre secuencias de ADN presentes en las cercanías de la unidad transcripcional y factores de transcripción nucleares existentes en un subtipo particular de células. La región ubicada hacia el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción es el promotor, quien resulta esencial para ensamblar al complejo mayor de transcripción formado por la ARN polimerasa II e iniciar el proceso de transcripción. Los promotores de una amplia variedad de genes comparten secuencias consenso como la TATAA box, la CAAT box y la CG box, que reconocen factores de transcripción ubicuos. Sin embargo, esta región sola es ineficiente para promover la expresión de genes en células transfectadas y en ratones transgénicos. Secuencias nucleotídicas capaces de interactuar con factores nucleares presentes sólo en una subpoblación restringida de células son las responsables de asegurar un patrón de expresión espacial y temporal único para cada gen. Otras secuencias de ADN participan en la regulación de los niveles de expresión de acuerdo a estadios fisiológicos particulares determinando aumentos (*enhancers*) o disminuciones (silenciadores) en la actividad transcripcional. Para entender las bases moleculares de estas interacciones, es necesario identificar las secuencias nucleotídicas que, actuando en *cis*, son reconocidas por proteínas transactivadoras. Así, las regiones flanqueantes que controlan la transcripción de un gen pueden ser testeadas en sistemas de expresión adecuados y proporcionar una herramienta muy útil para el aislamiento de factores de transcripción. El sistema de expresión más apropiado para el estudio de regiones de ADN regulatorias es el de ratones transgénicos. Este modelo permite analizar las regiones de ADN deseadas *in vivo*, en el contexto del animal entero, contrariamente a lo que ocurre cuando se emplean líneas celulares. Una vez identificadas las regiones de ADN capaces de dirigir correctamente la expresión del gen estudiado se utilizan varias metodologías experimentales complementarias que operan en base a la unión específica entre ADN y proteínas, como son los ensayos de retardamiento en geles, *in vivo* e *in vitro* footprinting, identificación de sitios hipersensibles a la ADNasa I y el clonado de genes por expresión,

que permiten la caracterización de los motivos de ADN y factores de transcripción involucrados en dicha regulación.

Si bien estos elementos regulatorios que participan en *cis* se encuentran por lo general en la vecindad de la unidad transcripcional de los genes, pueden existir regiones de control de un locus (LCR) ubicados a grandes distancias de las secuencias codificantes que resultan esenciales para la correcta expresión de ciertos genes, como por ejemplo los encontrados para los genes de β -globina humano y de lisozima de pollo (Grosveld *et al.*, 1987; Blom Van Assendfelt, 1989). Recientemente se han identificado regiones de asociación a la matriz nuclear (MARs) en los límites de zonas transcripcionalmente activas para varios genes que también se encuentran a grandes distancias de la unidad transcripcional. La presencia de LCRs y MARs específicos a ambos extremos de un transgén garantizaría una actividad transcripcional independiente del sitio de integración cromosomal del transgén.

La generación de animales transgénicos no sólo constituye una poderosa herramienta que permite la identificación de elementos regulatorios tejido específicos en el contexto de un organismo entero, sino que también posibilita, a través de la utilización de los mismos elementos, direccionar la expresión de genes heterólogos a determinados tejidos. Esto tiene una gran implicancia en el campo de la biotecnología y en la ciencia básica.

En el campo biotecnológico podemos mencionar algunos ejemplos, como la generación de cerdos transgénicos con órganos aptos para xenotransplantes en paciente humanos (Vanhove *et al.*, 1998); el direccionamiento de genes específicos en animales de interés comercial que permitan un mejor aprovechamiento de los mismos o de sus productos derivados, como por ejemplo, producción de leche con bajo contenido de lactosa por expresión de lactasa intestinal en glándula mamaria (Jost *et al.*, 1999), o la expresión de IGF-I en músculo esquelético para generar animales con mayor proporción de carcasa Pursel *et al.*, 1998); la generación de animales transgénicos como modelos de enfermedades para ser utilizados por la industria farmacéutica para estudiar el efecto de nuevas drogas o terapias (Van Steeg *et al.*, 1998; Riekkinen *et al.*, 1998); el direccionamiento de la expresión de genes de interés terapéutico a la glándula mamaria lactante de animales transgénicos de granja, o sea, la utilización de la glándula mamaria

como biorreactor (Paleyanda *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1991; Ebert *et al.*, 1991; Buhler *et al.*, 1990; Clark *et al.*, 1989), etc.

En ciencia básica las posibilidades son innumerables. Basta con mencionar la posibilidad de direccionar genes reporteros para estudiar expresión temporal y espacial de genes durante el desarrollo y determinados estadios fisiológicos (Young *et al.*, 1998); de generar modelos de animales para el estudio de enfermedades humanas (Bates *et al.* 1998; Bates *et al.* 1997; Borchelt *et al.*, 1998; Chen *et al.* 1998); de direccionar la expresión de genes citotóxicos para generar animales deficientes en un determinado tipo celular (Lowell *et al.*, 1993); o de direccionar la expresión de oncogenes para generar líneas celulares inexistentes (Cairns *et al.*, 1994; Son *et al.*, 1996); etc.

En el presente trabajo se utiliza la generación de animales transgénicos para estudiar la regulación de la expresión de genes que codifican para proteínas lácteas haciendo hincapié en el gen de β -caseína, y para estudiar la regulación célula-específica de la expresión del gen de proopiomelanocortina (POMC), que codifica para un precursor multipéptido que da lugar a una variedad de hormonas y neuropéptidos en corticotrofos y melanotrofos hipofisarios (Civelli *et al.*, 1982), en neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo (Watson *et al.*, 1978) y en neuronas del núcleo del tracto solitario (Shwartzberg y Nakane, 1983).

El estudio de la regulación de la expresión de los genes mencionados anteriormente nos ha permitido, en el primer caso, cimentar las bases para un proyecto biotecnológico de gran envergadura, mientras que el segundo caso, nos ha permitido acercarnos a un objetivo planeado a largo plazo, que es el aislamiento de un factor transcripcional específico de neuronas.

Estudio de la regulación de la expresión de genes que codifican para proteínas lácteas

La glándula mamaria

Si uno considera la escala filogenética evolutiva de los órganos, la glándula mamaria es una adquisición reciente. Este órgano apareció hace aproximadamente unos 200 millones de años para proveer alimento en forma de leche a los recién nacidos.

El desarrollo funcional de la glándula mamaria se produce en diferentes etapas que están determinadas por el estado hormonal del animal.

La glándula mamaria de un recién nacido consiste en unos pocos ductos rudimentarios en las vecindades del pezón. Antes de la pubertad, los ductos se elongan dentro del tejido graso mamario con una velocidad de expansión que acompaña al crecimiento del organismo. Con la llegada de la pubertad e inicio de la secreción de hormonas gonadales, aparecen brotes terminales (TEBs; del inglés: *terminal end buds*) y los ductos se empiezan a clongar en forma acelerada y sufren ramificaciones. El crecimiento se detiene cuando el tejido graso está cubierto por estructuras ramificadas. Los TEBs son estructuras especializadas que se encuentran al final de los ductos en crecimiento y consisten de dos tipos celulares, las células del cuerpo, que originan las células epiteliales mamarias, y las células cap, que son las precursoras de las células mioepiteliales. (Humphreys *et al.*, 1996). La arborización de los ductos es iniciada por los altamente proliferativos TEBs (Daniel y Silberstein, 1987). La morfogénesis de los ductos y formación del lumen se lleva a cabo gracias por un proceso de proliferación y muerte celular regulado en los TEBs (Bresciani 1968; Humphreys *et al.*, 1996). Durante la preñez se producen ramificaciones adicionales de ductos y una gran proliferación lóbulo–alveolar, que, al momento del parto, llena completamente el tejido graso. La división celular persiste en las poblaciones de células que forman los ductos y alvéolos durante toda la preñez y lactancia temprana.

La diferenciación funcional en un epitelio secretorio coincide con el parto y como consecuencia, se producen altos niveles de leche durante el período de lactancia. Luego del destete, el compartimiento epitelial alveolar se remodela y la glándula mamaria vuelve a asemejarse a la existente en estado virgen. En cada preñez ocurre un nuevo ciclo de desarrollo lóbulo–alveolar.

En 1928, Stricker y Grueter demostraron que la inyección de extractos de pituitaria en conejos vírgenes castrados inducía la liberación de leche. Este hecho evidenció la importancia de la prolactina como hormona lactogénica. Sin embargo, la presencia de hormonas lactogénicas no es suficiente para explicar el complejo proceso de desarrollo o la regulación de la expresión temporal observada en la glándula mamaria emergente durante la preñez.

La prolactina es una molécula clave en el proceso de proliferación alveolar e inducción de la diferenciación terminal, como queda evidenciado por la activación transcripcional de los genes de proteínas lácteas (Burdon *et al.*, 1991; Topper y Freeman, 1980; Andres *et al.*, 1987; Schmitt–Ney *et al.*, 1991; Pittius *et al.*, 1988[1]; Pittius *et al.*, 1988[2]; Vonderhaar, 1987). Existen varios factores transcripcionales que se pegan en forma específica a diferentes secuencias del promotor de estos genes (Schmitt–Ney *et al.*, 1991; Altiock y Groner, 1993; Meier y Groner, 1994; Welte *et al.*, 1994; Raught *et al.*, 1995). Uno de ellos, que se pega a secuencias conservadas en los promotores de genes lácteos, es indispensable para la inducción de tipo hormonal. Este factor transcripcional se llama factor de glándula mamaria (MGF; del inglés: *mammary gland factor*) o Stat 5, un miembro de la familia Stat (del inglés: *signal transducer and activator of transcription*; Wakao *et al.*, 1992; Groner y Gouilleux, 1995). En tejido mamario de ratón se encuentran dos isoformas de Stat5, Stat5a y Stat5b (Liu *et al.*, 1995). Ambas proteínas están presentes en animales vírgenes púberes y adultos. Durante la preñez tardía y lactancia se puede detectar un pequeño aumento de las mismas, que luego del destete disminuye.

La prolactina, hormona de crecimiento (GH; del inglés: *growth hormone*), factor de crecimiento epidérmico (EGF; del inglés: *epidermal growth factor*), eritropoyetina y otras citoquinas, regulan la transcripción específica de varios genes a través de la vía Janus quinasa (JAK)–Stat (Schindler y Darnell, 1995). El ligando desencadena una dimerización u oligomerización de los receptores. Como consecuencia, las quinasas de tirosinas asociadas a los receptores (JAKs) se fosforilan a ellas mismas, en forma cruzada, y fosforilan a los residuos tirosina de los receptores. A continuación, las proteínas Stat presentes en citoplasma son reclutadas por el complejo del receptor y luego fosforiladas. Dos proteínas Stat pueden dimerizarse, ser translocadas al núcleo y luego activar la transcripción específica de genes por interacción con sitios GAS (*γ interferon activation site*; secuencia consenso: TTCNNGAA) en los promotores (Ihle *et al.*, 1994; Schindler y Darnell, 1995).

Si bien distintos receptores activan grupos de Stat que pueden superponerse, es posible lograr una señal específica a través de la activación de distintos sets de homo y heterodímeros.

En glándula mamaria, la prolactina activa las Stat5 a y b, y luego de la dimerización son translocadas al núcleo, donde se pegan a los sitios GAS y activan la transcripción de los genes blanco, y consecuentemente la proliferación, diferenciación y lactogénesis. En la glándula funcional postparto se encuentran altos niveles de Stat5 a y b fosforilado, y bajos niveles de Stat1 y Stat3 fosforilados (Liu *et al.*, 1996). En ratones, el estado de fosforilación de Stat5 a y b es muy bajo en la glándula mamaria virgen y durante el inicio de la preñez, pero aumenta sustancialmente el día 14 de la preñez. Estas evidencias hacen suponer que la activación de Stat5 es un paso crítico en la diferenciación terminal del epitelio mamario secretorio (Liu *et al.*, 1996).

Los estrógenos y la progesterona también son necesarios para el crecimiento de los ductos (Korach, 1994) y la proliferación alveolar (Lydon, 1995), respectivamente.

Durante la pubertad, el crecimiento de los ductos y, en parte, la proliferación alveolar son controlados por hormonas esteroideas (Daniel y Silberstein, 1987). En animales ovariectomizados ocurre una regresión del crecimiento de los ductos y alveolos, que a la vez puede ser reinducido por estrógenos y progesterona (Mixner y Turner, 1942).

Mientras tanto, la oxitocina cumple un rol fundamental en la eyección de leche y desarrollo postparto como quedó demostrado en ratones mutantes para ese gen (Young *et al.*, 1996; Nashimori *et al.*, 1996). A su vez, la ausencia de eyección de leche lleva a una rápida involución de la glándula (Wagner *et al.*, 1997). Por lo tanto, la oxitocina es también esencial para la proliferación alveolar.

Por otro lado, también es imprescindible la presencia de reguladores del crecimiento y de la progresión del ciclo celular para la proliferación alveolar y diferenciación.

Ratones deficientes en CSF-1 (factor estimulante de colonias de macrófagos) tienen crecimiento disminuido de los ductos, desarrollo precoz de los lóbulos y ausencia de secreción de leche (Pollard y Hennighausen, 1994).

También se han adjudicado funciones específicas en el proceso de mamopoyesis al TGF β (Gorska *et al.*, 1998) y otros miembros de la misma familia, como las inhibinas y activinas (Robinson y Hennighausen, 1997).

Las cascadas y redes de señales que llevan a la respuesta nuclear y subsecuente activación de programas de desarrollo no se conocen mucho, a pesar que distintos roles morfogénicos y lactogénicos han sido asignados a hormonas sistémicas y factores de

crecimiento locales. Aún no han sido caracterizados genes blanco para el control del crecimiento y diferenciación. Es factible que los factores de transcripción y componentes de la maquinaria del ciclo celular sean los responsables de dichos eventos. Ratones deficientes en los factores de transcripción Λ -myb y C/EBP β poseen un desarrollo alveolar y proliferación disminuídos durante la preñez (Toscani *et al.*, 1997; Hennighausen y Robinson 1998), mientras que ratones deficientes en el gen de la ciclina D1 no pueden desarrollar alveolos funcionales durante la preñez (Fantl *et al.*, 1995; Sicinsky *et al.*, 1995)

Finalmente, hay que destacar que las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular cumplen un rol importante en la regulación de la expresión específica de genes, morfogénesis y apoptosis en cada una de las etapas del desarrollo de la glándula mamaria (Roskelley *et al.*, 1995).

Por lo tanto, el desarrollo de la glándula mamaria durante la preñez se produce en forma progresiva y las células epiteliales alveolares llegan a una diferenciación terminal al final del período de gestación. Esta transformación se puede definir como un proceso de activación secuencial de genes que codifican para proteínas lácteas (Robinson *et al.*, 1995).

Composición de la leche

El producto de secreción de la glándula mamaria, la leche, está compuesta, en bovinos, por 86% de agua, 5% de lactosa, 4,1% de grasas, 3,6% de proteínas, 0,7% de minerales y 0,6% de otros compuestos, dentro de los cuales tienen gran importancia las vitaminas liposolubles. Las proteínas lácteas se dividen en dos grandes grupos. El primero de ellos está constituido por las caseínas, que se caracterizan por formar una suspensión coloidal de micelas y por precipitar en medio ácido, y en algunas especies, como en bovinos, pueden llegar a representar cerca del 80 % de las proteínas totales de leche. El segundo grupo lo conforman las proteínas de suero que se encuentran en solución.

Las caseínas son cadenas polipeptídicas que tienen una estructura secundaria poco compleja, con alta hidrofobicidad y una carga neta negativa. Otra característica es que poseen un alto contenido de prolina, que interrumpen la formación de estructuras secundarias, abundancia de amino ácidos esenciales y bajo contenido de cistinas.

Normalmente son fosforiladas en Golgi, en residuos de serina accesibles que tengan la secuencia Ser/Thr-X-Ser/Thr, siendo X cualquier amino ácido. La fosforilación es esencial, ya que les permite acomplejar Ca^{2+} y otras funciones (Mercier, 1981).

La presencia de las caseínas en la leche se produce en forma de micelas con un diámetro que varía entre 20 y 600 nm. Estas micelas se mantienen unidas por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. A su vez, las caseínas, que se encuentran en una proporción $\alpha_{s-1}:\beta:\alpha_{s-2}:\kappa$ de 3:1:3:1, se agregan a ellas mismas o a otras caseínas por interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, atracciones electrostáticas (entre Ca^{2+} y Ser PO_4) o repulsiones (entre grupos PO_4) y puentes disulfuro. Los componentes del cuerpo de las micelas son las α_{s-1} , β , α_{s-2} caseínas, mientras que la κ -caseína, debido a su naturaleza hidrofílica, permanece en la superficie de las mismas. La proteólisis específica de la κ -caseína por la renina, una combinación de quimosina y pepsina, desencadena la precipitación de las caseínas por desestabilización de las estructuras micelares.

La función de las micelas es secuestrar calcio y transportarlo en forma utilizable para el recién nacido, que lo utiliza para el desarrollo de los huesos.

El otro gran grupo de proteínas lácteas, las proteínas de suero, tienen una estructura globular y compacta, con una distribución uniforme de los residuos cargados (Fox, 1982), contrariamente a lo que ocurre con las caseínas que mantienen aminoácidos con propiedades similares agrupados en su estructura. Las proteínas de suero tienen un alto contenido de cistinas, cuyos puentes disulfuro contribuyen al sabor de la leche. Por otro lado, las proteínas de suero son más hidrofílicas que las caseínas, ya que los residuos hidrofóbicos se mantienen escondidos dentro de sus estructuras globulares, lo que permite que se mantengan en solución.

Quizás, la proteína más importante en suero sea la α -lactalbúmina, que se ha encontrado en la leche de todas las especies estudiadas. Esta proteína es una metaloproteína de calcio que interactúa con UDP-galactosiltransferasa para formar la lactosa sintetasa (Kuhn, 1983 review). También se le ha adjudicado una participación clave en el proceso de lactogénesis (Hayssen y Blackburn, 1985)

La β -lactoglobulina, otra de las proteínas componentes del suero, se encuentra presente en muchas especies, pero no es encontrada en leche murina y humana. En rumiantes es la

proteína de suero predominante, y junto con la α -lactalbúmina, contribuye aproximadamente a un 20% del total de las proteínas lácteas. Su función se desconoce, aunque con certeza, aunque por su similitud estructural con la *retinol binding protein* (Hayes *et al.*, 1993; Pervaiz y Brew, 1985) y lipocalinas, se le adjudica un determinado rol en el transporte de ácidos grasos y vitamina A.

Por último, la proteína ácida de suero o WAP (del inglés: *Whey Acidic Protein*) sólo ha sido encontrada en ratón, rata y conejo. Nunca ha sido detectada en leche de otras especies mucho mejor estudiadas, como la de rumiantes. En roedores constituye la proteína de suero más abundante, superando varias veces la expresión de la α -lactalbúmina (Zamierowsky y Ebner, 1980)

Genes que codifican para proteínas lácteas

Estudios genéticos y estructurales de las proteínas de leche bovinas y otras especies han contribuido enormemente al conocimiento de los genes relevantes. En la década del 70 se conoció la estructura primaria de los componentes de las caseínas. Por intermedio de estos estudios se lograron identificar sólo cuatro tipos de caseínas (α_{S-1} , α_{S-2} , β y κ)¹, pese a la gran heterogeneidad del total de las mismas, que es debida, principalmente, a fosforilaciones incompletas e hidrólisis parciales por plasmina.

En 1964, Grosclaude *et al.* lograron demostrar un alto ligamiento entre los genes de las caseínas α_{S-1} y β bovinas, y nueve años más tarde se postuló el primer orden relativo del locus de las mismas, siendo este α_{S-1} , β y κ (Grosclaude *et al.*, 1973). Posteriormente, por análisis de paneles de células somáticas híbridas, se encontró sintenia en ratón (Gupta *et al.*, 1982) y conejo (Dalens y Gellins, 1986). En la tabla 1 se muestra la ubicación cromosomal del locus de las caseínas en diferentes especies estudiadas y sus respectivas referencias.

Tabla 1: Ubicación del locus de las caseínas en distintas especies

Especie	Cromosoma	Referencia
Ratón	5	Geissler <i>et al.</i> , 1988
Conejo	12	Gellin <i>et al.</i> , 1985
Hombre	4	Menon <i>et al.</i> , 1992
Oveja	4	Hayes <i>et al.</i> , 1993
Vaca	6	Threadgill y Womack, 1990

Más recientemente, por análisis de restricción de clones bovinos insertados en cromosomas artificiales de levadura, se ha establecido el orden final α_{s-1} , β , α_{s-2} y κ del locus de las caseínas, en un agrupamiento que comprende aproximadamente 200 kb (Ferretti *et al.*, 1990; Threadgill y Womack, 1990).

Los genes de las caseínas son estructuralmente diferentes, ya que el tamaño de las unidades transcripcionales se encuentran en un rango que varía entre 8,5 a 18,5 kb y el número de intrones varía de 4 a 18. Sin embargo, se supone la existencia de un gen ancestral común para los genes α_{s-1} , α_{s-2} y β (Gaye *et al.*, 1977). Esta hipótesis está basada en la presencia de motivos comunes en la regiones 5'flanqueantes y un patrón de organización similar en los primeros cuatro exones, principalmente el exón 2 que contiene parte de la región 5' no traducida y la región codificante del péptido señal y los dos primeros amino ácidos de la cadena polipeptídica madura (Jones *et al.*, 1985). Actualmente, se cree que las α_{s-1} , α_{s-2} y β -caseínas evolucionaron a partir de un gen primitivo compuesto de unos pocos exones, uno de ellos correspondiente a la región 5' no traducida y otros codificando para un sitio de fosforilación y un péptido hidrofóbico. Este gen, probablemente aumentó su tamaño por duplicaciones intragénicas y luego, mediante duplicaciones intergénicas, aparecieron nuevos genes (Jones *et al.*, 1985).

Contrariamente, el gen de la κ -caseína no contiene motivos o patrones estructurales comunes a las otras caseínas. Este gen está relacionado evolutivamente con la familia del gen del fibrinógeno, que codifican para genes con funciones similares a la κ -caseína

(Jollès *et al.*, 1974). Por ejemplo: la proteólisis limitada de estas proteínas desencadena la coagulación sanguínea.

Los genes que codifican para proteínas de suero no están agrupados dentro de familias como es el caso de las caseínas. En la tabla 2 se menciona en qué cromosoma se ubican estos genes en distintas especies y sus respectivas referencias.

Tabla 2: Ubicación de los loci correspondientes a genes que codifican para proteínas de suero en distintas especies

Locus	Especie	Cromosoma	Referencia
β -lactoglobulina	Vaca	11	Hayes <i>et al.</i> , 1993 (2)
β -lactoglobulina	Oveja	3	Hayes <i>et al.</i> , 1993 (2)
β -lactoglobulina	Cabra	11	Hayes <i>et al.</i> , 1993 (2)
α -lactalbúmina	Vaca	5	Threadgill y Womack, 1990
α -lactalbúmina	Oveja	3	Imam-Ghali <i>et al.</i> , 1991
α -lactalbúmina	Hombre	12	Davies <i>et al.</i> , 1987
WAP	Ratón	11	Mepham <i>et al.</i> , 1993

Es importante destacar que se han encontrado importantes similitudes estructurales entre el gen de la α -lactalbúmina y el de la lisozima, atribuyéndose a ambos un origen evolutivo común (Brew *et al.*, 1967), mientras que la β -lactoglobulina, como se mencionó anteriormente tendría un origen común con la *retinol binding protein* (Hayes *et al.*, 1993; Pervaiz y Brew, 1985).

Regulación de la expresión de genes lácteos

Los genes que codifican para proteínas lácteas constituyen un modelo paradigmático para el estudio de la expresión tejido específica de genes eucariotas. Como se mencionó anteriormente, las células epiteliales de la glándula mamaria sufren un intenso proceso de proliferación y diferenciación luego de que una hembra progresa hacia los estadios de

preñez y de lactancia, proceso que está controlado principalmente por hormonas lactogénicas y glucocorticoides.

Este proceso lleva aparejado un aumento elevado de la transcripción de varios genes que codifican para proteínas presentes en la leche. Los niveles de expresión de genes de proteínas lácteas están regulados por insulina, prolactina, progesterona y glucocorticoides (Vonderhaar y Ziska, 1989). Las primeras inducen o modifican factores transcripcionales a través de mecanismos de transducción de señales intracelulares mientras que las hormonas esteroideas intreractúan directamente con su sitio de reconocimiento en el ADN a través de la unión de un complejo esteroide-receptor.

Un ejemplo de los cambios dramáticos que operan sobre estos genes, lo ilustra el aumento de 250 veces del ARNm de β -caseína al comparar los niveles presentes en la glándula mamaria de rata virgen con los del día 8 de lactancia, momento en el cual el ARNm de β -caseína constituye el 20 % del ARN poli- (A)⁺ presente en la glándula (Hobbs *et al.*, 1982).

A su vez, la expresión del gen WAP también está regulada durante el desarrollo glandular por hormonas lactogénicas pero su patrón de expresión es diferente al de las caseínas. Por ejemplo, la expresión de caseínas aumenta enormemente el día 10 de la preñez en ratones mientras que el ARNm de WAP no aumenta significativamente hasta el día 16 (Pittius *et al.*, 1988). La expresión de WAP depende más fuertemente del entorno extracelular que la expresión del gen de β -caseína: mientras el gen de β -caseína logra expresarse adecuadamente en cultivos primarios de células epiteliales de glándula mamaria sembradas sobre colágeno, el gen de WAP se mantiene silente (Lee *et al.*, 1985).

La regulación de la expresión de genes que codifican proteínas de la leche está mediada por la combinación de elementos de respuesta que contienen múltiples sitios de unión a factores de transcripción. En las secuencias promotoras de los genes de proteínas del suero hay sitios de unión para el factor nuclear I (NF-I; del inglés: *Nuclear Factor I*), para el receptor de glucocorticoides (GR) y para Stat5, mientras que en las secuencias promotoras de los genes de las caseínas se encuentran sitios de unión para Stat5, Yin Yang 1 (YY1), la proteína activadora CCAAT (C/EBP; del inglés: *CCAAT/enhancer binding protein*) y GR (Rosen *et al.*, 1998).

En la figura 1 se muestra el caso específico del gen de la β -caseína bovino, donde se han identificado varias regiones importantes en la parte 5' proximal del promotor que serían responsables de la expresión del gen.

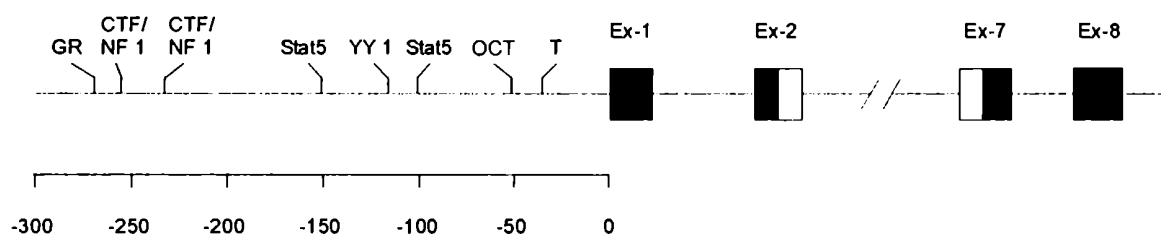


Figura 1: Representación esquemática del gen de β -caseína bovino. El gen tiene 8 exones y 8,6 kb. Los rectángulos corresponden a los exones (ex). Las zonas negras son las regiones 5' y 3' no traducidas, mientras que la zona blanca corresponde a la zona traducida. En la zona 5' flaqueante se muestran las ubicaciones de los sitios involucrados en la regulación transcripcional del gen entre el inicio de transcripción y la base -300. Abreviaturas: Gr, sitio de binding a glucocorticoides; OCT1, sitio consenso; NF1, sitio de binding del factor nuclear 1; Stat5, sitio de binding a Stat5; YY1; sitio Ying Yang; T: tata box.

La falta de una línea celular mamaria que recapitule completamente los distintos estadios fenotípicos de diferenciación que se llevan a cabo durante la preñez y la lactancia en la glándula mamaria, retrasó las investigaciones en esta área. Sin embargo, en los últimos años, la utilización de ratones transgénicos como sistema de expresión posibilitó el direccionamiento de proteínas heterólogas a la glándula mamaria. Por ejemplo, se han generado modelos animales en ratones transgénicos para estudiar el papel específico que ciertos oncogenes desempeñan en la etiología del cáncer de mama (Andres *et al.*, 1987, 1988). Mediante esta estrategia se podría lograr la inmortalización de líneas celulares mamarias capaces de mantener un fenotipo de máxima diferenciación de manera similar a líneas celulares inmortales que se han obtenido a través de la formación de tumores en otros órganos de ratones transgénicos. Otra aplicación novedosa con importantes consecuencias en el área de la biotecnología, es la utilización de la glándula mamaria de

animales de granja como biorreactores que sobreexpresen proteínas humanas recombinantes de interés farmacéutico. La identificación de los elementos regulatorios de genes de proteínas lácteas resulta crucial para el diseño de vectores óptimos capaces de direccionar la expresión de proteínas heterólogas a la glándula mamaria y ser, a su vez, secretadas en la leche. Mediante esta estrategia se ha logrado producir ratones transgénicos capaces de secretar en la leche las siguientes proteínas humanas biológicamente activas: activador tisular del plasminógeno (Gordon *et al.*, 1987), α 1-antitripsina (Archibald *et al.*, 1990) y uroquinasa (Meade *et al.*, 1990). A partir de estos resultados, distintos laboratorios intentaron reproducir esta estrategia en animales de granja capaces de producir grandes volúmenes diarios de leche y por lo tanto grandes cantidades diarias de proteínas transgénicas. Así, durante los últimos años se generaron varios animales de granja que secretan en la leche compuestos proteicos de interés farmacéutico tales como ovejas productoras de factor IX de coagulación humano (Clark *et al.*, 1989) y α 1-antitripsina humana (Wright *et al.*, 1991), conejos con interleukina-2 humana (Buhler *et al.*, 1990) y cabras productoras de activador tisular del plasminógeno humano (Ebert *et al.*, 1991).

Los vectores de expresión óptimos capaces de direccionar la biosíntesis de proteínas de valor comercial a la leche de animales de granja deben cumplir con tres características: 1) la expresión transgénica debe estar exclusivamente acotada a las células epiteliales de la glándula mamaria, lo cual asegura la secreción exócrina de la proteína recombinante. La expresión ectópica del transgén, debido al uso de promotores incompletos, puede interferir con los procesos fisiológicos normales del animal; 2) las proteínas transgénicas deben ser secretadas a la leche en altas cantidades y 3) las proteínas secretadas deben ser biológicamente activas. En este último sentido, el grado de procesamiento postraducciona l de las células epiteliales mamarias es muy completo. Un buen ejemplo para destacar es el factor IX de la coagulación (FIX) humano producido en leche de ovejas. Este factor se sintetiza normalmente en hígado y sufre una serie prolongada de modificaciones postraduccionales que incluyen glicosilación, β -hidroxilación y γ -carboxilación dependiente de vitamina K. Estas modificaciones complejas suponen que la producción de FIX biológicamente activo pueda obtenerse sólo en células de animales. Así, mientras distintas líneas celulares transfectadas con varios vectores producen factor

IX de muy baja actividad biológica, las ovejas transgénicas para FIX secretan en leche un factor con alta actividad específica (Clark *et al.*, 1989).

La glándula mamaria como biorreactor

Como se mencionó anteriormente, la leche está compuesta por una suspensión coloidal de micelas de caseína, una emulsión de lípidos y vitaminas liposolubles y una solución de proteínas, minerales y lactosa. Esta composición varía según la especie. Por ejemplo, la leche de cabra contiene 29 g/l de proteína, 45 g/l de lípidos y 41 g/l de lactosa. Para producir un litro de leche de cabra, es necesario que circulen unos 400 l de sangre por la glándula mamaria transportando los nutrientes necesarios. La glándula toma aproximadamente un 25% o más de la glucosa sanguínea que pasa por ella, destinada a incrementar la síntesis proteica y la producción de lactosa y lípidos. En promedio, una cabra adulta produce unos 600–800 l de leche anualmente, mientras que una vaca produce aproximadamente unos 8000 l.

Durante el período de lactancia, las células epiteliales de la glándula mamaria son capaces de sintetizar grandes cantidades de proteínas lácteas en las paredes del retículo endoplasmático rugoso, que son destinadas a la leche mediante transporte vacuolar y fusión con la membrana plasmática. También es importante destacar que sumado a la alta tasa de síntesis proteica, existe una alta densidad celular, aproximadamente 100–1000 veces mayor que la alcanzada en cultivos celulares, que permite producir grandes cantidades de proteínas en comparación a otros sistemas de expresión. Por otro lado, la glándula mamaria también es capaz de llevar a cabo modificaciones posttraduccionales complejas, como glicosilaciones y γ -carboxilaciones.

Por lo tanto, la glándula mamaria constituye un biorreactor incomparable, abastecido por nutrientes obtenidos de la dieta normal del animal huésped. Considerando la producción promedio anual de leche de una vaca (6000–8000 L) y que el contenido de β -caseína en leche es de aproximadamente de 10 gr/L, una vaca con un transgén bajo el control transcripcional del promotor de β -caseína con niveles de expresión que lleguen sólo al 10% del gen endógeno, debería producir hasta 8 kg de proteína recombinante anualmente.

En la tabla 3 se comparan algunos datos de diferentes especies elegidas normalmente para utilizar la glándula mamaria como biorreactor. Una de las primeras consideraciones que se tienen en cuenta es la producción anual de leche. En ese aspecto, la vaca es muy ventajosa en comparación a otros mamíferos, pero en contrapartida, tiene intervalos generacionales muy largos que no permiten obtener resultados a corto plazo y es necesario manejar una gran cantidad de vientres para obtener un animal transgénico, debido a que en general nace sólo un ternero por madre y a que el porcentaje de transgénesis es muy bajo. Los cerdos tienen la ventaja de parir camadas numerosas pero a su vez, no son empleados normalmente para la producción lechera.

Tabla 3: Datos de reproducción y producción de leche en reatones, cabras y vacas

Animal	Tamaño de camada	Transgénesis (%)	Gestación (meses)	Madurez reproductiva (meses)	Primer período lactante (meses)	Producción de leche por período lactante (meses)
Ratón	8-10	10-25	0,75	1	3-6	0,0015
Cabra	1-2	5-10	5	6-8	12-15	600-800
Vacas	1	5-10	9	15	30-33	8000

Para realizar la elección debe considerarse que requerimientos de la proteína recombinante a producir existe en el mercado, rapidez en que se tienen que obtener resultados y facilidades locales, como provisión de embriones y disponibilidad de lugar para mantener manadas de animales.

Cuando uno trabaja con animales grandes, los resultados son a muy largo plazo, debido a los grandes intervalos generacionales. Por lo tanto, los ratones, si bien no son aptos para utilizarse como biorreactores por la poca cantidad de leche que producen, constituyen un modelo excelente para testear promotores y construcciones, y por otro lado, la eficiencia de la glándula mamaria para producir una proteína biológicamente activa. Es decir, en poco tiempo se puede determinar la viabilidad de un proyecto y a muy bajo costo, para luego llevar a cabo el *scale up* en animales de granja con una alta probabilidad de éxito. Entre los datos que se pueden determinar en modelos de ratones transgénicos podemos

mencionar los inherentes al promotor o construcción, como la expresión espacial y temporal, expresión a nivel celular dentro de la glándula mamaria, independencia del sitio de inserción y niveles de proteína recombinante en leche, y los inherentes a la glándula mamaria, como capacidad de procesamiento posttraduccional, actividad biológica, estabilidad de la proteína, etc.

La mayoría de los promotores que codifican para proteínas de la leche se utilizaron para dirigir la expresión de genes a la glándula mamaria. (tabla 4). Algunos de ellos han sido empleados extensivamente y han producido niveles altos de proteínas recombinantes en la leche (por encima de 1 mg/ml) de animales transgénicos, como los promotores de β -lactoglobulina de oveja, β -caseína de cabra, y α 1-caseína bovina (Simons *et al.*, 1983; Persuy *et al.*, 1992; Meade *et al.*, 1990). En general la expresión resulta mejor cuando se utilizan secuencias genómicas en vez de ADNc del gen que se desea expresar (Whitelaw *et al.*, 1991; Hurwitz *et al.*, 1994) y cuando se incluyen intrones y exones no traducidos (Whitelaw *et al.*, 1991).

Con las secuencias promotoras del gen WAP de ratón se obtuvieron niveles de expresión bajos (por debajo de los 100 ng/ml) e intermedios (por debajo de 1 mg/ml). Pese a esto fue utilizado en animales de granja para producir proteínas de interés terapéutico (Velander *et al.*, 1992[2]). Contrariamente, cuando se utilizó el promotor de WAP de conejo se obtuvieron niveles elevados de proteínas recombinantes en ratones (Bischoff *et al.*, 1992; Devinoy *et al.*, 1994)

Hasta el momento el promotor de α -lactalbúmina no ha sido caracterizado extensivamente como otros y sólo se lograron obtener niveles de expresión considerables cuando se utilizó el gen completo bovino (Bleck y Bremer, 1993) o caprino (Soulier *et al.*, 1992). Con respecto a los promotores de la α _{s-2}-caseína y κ -caseína, sólo se intentó generar ratones transgénicos con clones genómicos de los mismos, y los resultados fueron poco alentadores, ya que se detectaron bajos niveles de ARNm transgénico en el caso de la α _{s-2}-caseína y no se detectó expresión de ARNm transgénico de κ -caseína (Rijnkels *et al.*, 1995).

Contrariamente a lo que ocurre con el promotor caprino de β -caseína, con las versiones de rata y conejo no se lograron buenos resultados (Lee *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1989; Buhler *et al.*, 1990).

Con respecto al promotor bovino de β -caseína, experimentos de transfección estable llevados a cabo en una línea celular de glándula mamaria demostraron que las secuencias 5' proximales contienen los elementos necesarios para producir eventos transcripcionales regulados por componentes de la matriz extracelular y un balance definido de hormonas lactogénicas (Schmidhauser *et al.*, 1990; Schmidhauser *et al.*, 1992). Mediante análisis delecionales se observó que los niveles de expresión de los genes reporteros utilizados en esos experimentos dependen altamente de la presencia una porción proximal al promotor de 1,7 kb (Ball *et al.*, 1988; Devinoy *et al.*, 1988; Doppler *et al.*, 1989; Doppler *et al.*, 1990; Eisenstein y Rosen 1988; Schmidhauser *et al.*, 1990; Schmidhauser *et al.*, 1992). Esto concuerda con el hecho que varios de elementos actuantes en *cis* y sus correspondientes enhancers y represores transcripcionales se encuentran dentro de dicha área (Altiok y Groner 1993; Meier y Groner 1993; Schmitt-Ney *et al.*, 1992). Sin embargo, cuando se utilizó 1,7 kb de la región proximal 5'flanqueante del gen bovino de β -caseína para direccionar la expresión de genes heterólogos a la glándula mamaria de ratones transgénicos, los resultados no fueron del todo muy claros. Maga *et al.* (1994) intentaron direccionar la expresión de lisozima en ratones transgénicos, pero el promotor resultó transcripcionalmente inactivo. Por otro lado, Ninomiya *et al.* (1994), utilizando las mismas secuencias de β -caseína lograron expresar hGH en ratas, aunque los niveles de expresión fueron muy variables, desde muy bajos (0.11 μ g/ml) a muy altos (10 mg/ml), y además, no se logró detectar expresión en todas las líneas. Los resultados más claros fueron obtenidos por Rijnkels *et al.* (1995), pero utilizando un clon genómico de 34 kb que abarca la unidad transcripcional completa del gen bovino de β -caseína, 16 kb de la región 5'flanqueante y 8 kb de la región 3'flanqueante. En general, cuando se utilizan clones genómicos que abarquen la unidad transcripcional completa y una buena porción de secuencias flanqueantes de un mismo gen lácteo, se logran niveles de expresión elevados (Bayna y Rosen, 1990; Wall *et al.*, 1991; Bleck y Bremer, 1993; Soulier *et al.*, 1992; Simons *et al.*, 1987; Shani *et al.*, 1992; Persuy *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1992) Por otro lado, en ninguno de los trabajos previos en que se estudió la región 5'proximal del gen de β -caseína se caracterizó el promotor más allá de los niveles de expresión producidos.

En el presente trabajo se pretende analizar si 3,8 kb de la región 5'proximal del gen de β -caseína son capaces de dirigir la expresión de genes heterólogos a la glándula mamaria, e intentar recapitular la expresión espacial y temporal correcta en el contexto de un animal entero, así como obtener niveles altos de expresión de las proteínas recombinantes. Posteriormente, en base a los resultados obtenidos, se evaluará la posibilidad de llevar adelante un proyecto de carácter biotecnológico con el promotor estudiado, que implique la utilización de la glándula mamaria como biorreactor destinado a la producción de proteínas de uso terapéutico.

Tabla 4 : Utilización de promotores específicos de glándula mamaria para generar animales transgénicos

Promotor	Extensión del promotor	Gen expresado	Animal	Niveles de expresión	Referencia
WAP-rata	gen entero	WAP rata	Ratón	27% del endógeno	Bayna y Rosen, 1990
WAP-ratón	2,5 kb 5'	Oncogén H-ras	Ratón	Produjo tumores	Andres <i>et al.</i> , 1987
WAP-ratón	2,6 kb 5'; PolyA SV40	ADNc t-PA	Ratón	300 ng/ml	Gordon <i>et al.</i> , 1987
WAP-ratón	2,6 kb 5'; PolyA SV40	ADNc t-PA	Cabra	3 µg/ml	Ebert <i>et al.</i> , 1991
WAP-ratón	1,8 kb 5'; poly A bGH	ADNc CD4 humano	Ratón	10-200 ng/ml	Yu <i>et al.</i> , 1989
WAP-ratón	gen entero	WAP ratón	Cerdo	1 mg/ml	Wall <i>et al.</i> , 1991
WAP-ratón	2,3 kb 5'; 1,6 kb 3'	ADNc SOD humano	Ratón	0,7 mg/ml	Hansson <i>et al.</i> , 1994
WAP-ratón	2,6 kb 5'; 1,6 kb 3'	ADNc proteína C humano	Ratón	3 µg/ml	Velander <i>et al.</i> , 1992[1]
WAP-ratón	2,6 kb 5'; 1,6 kb 3'	ADNc proteína C humano	Cerdo	0,001-1 mg/ml	Velander <i>et al.</i> , 1992[2]
WAP-ratón	4,2 kb 5'	ADNg proteína C humano	Ratón	0,1-0,7 mg/ml	Drohan <i>et al.</i> , 1994
WAP-ratón	2,5 kb 5'; 4,6 kb 3'	ADNc factor VIII humano	Cerdo	1-2,7 µg/ml	Paleyanda <i>et al.</i> , 1997
WAP-conejo	17,6 kb 5'	ADNg α1-antitripsina humano	Ratón	10 mg/ml	Bischoff <i>et al.</i> , 1992
WAP-conejo	6,3 kb 5'	ADNg hGH humano	Ratón	4-22 mg/ml	Devinoy <i>et al.</i> , 1994
α-lactalbúmina-cobayo	1195 pb 5'; 395 pb 3'	α-lactalbúmina cobayo	Ratón	NC	Maschio <i>et al.</i> , 1991
α-lactalbúmina-ovino	gen entero	α-lactalbúmina bovino	Ratón	1,5 mg/ml	Bleck y Bremer, 1993
α-lactalbúmina-ovino	750 pb 5'; 336 pb 3'	ADNc α-lactalbúmina bovino	Ratón	0,0025-0,45 mg/ml	Vilotte <i>et al.</i> , 1989
α-lactalbúmina-ovino	477 pb 5'; 336 pb 3'	ADNc α-lactalbúmina bovino	Ratón	0,1 mg/ml	Soulier <i>et al.</i> , 1992
α-lactalbúmina-cabra	gen entero	α-lactalbúmina cabra	Ratón	1,2-3,7 mg/ml	Soulier <i>et al.</i> , 1992
β-lactoglobulina-oveja	4 kb 5'; 1,9 kb o 7,3 kb 3'	β-lactoglobulina oveja	Ratón	23 mg/ml	Simons <i>et al.</i> , 1987
β-lactoglobulina-oveja	3 kb 5'	α1-antitripsina humano	Ratón	0,4-7,3 mg/ml	Archibald <i>et al.</i> , 1990
β-lactoglobulina-oveja	3 kb 5'	α1-antitripsina humano	Oveja	35 mg/ml	Wright <i>et al.</i> , 1991
β-lactoglobulina-oveja	3,5 o 10,8 kb 5'; 8 kb 3'	β-lactoglobulina oveja	Ratón	1-8,5 mg/ml	Shani <i>et al.</i> , 1992
β-lactoglobulina-oveja	3 kb 5'	ADNc HSA	Ratón	Sin expresión	Shani <i>et al.</i> , 1992
β-lactoglobulina-oveja	3 kb 5'	ADNc HSA	Ratón	2,5 mg/ml	Shani <i>et al.</i> , 1992
β-lactoglobulina-oveja	1,8 kb 5'; 4,6 kb WAP 3'	ADNc SOD humano	Ratón	10 ng/ml	Hansson <i>et al.</i> , 1994
β-lactoglobulina-oveja	4,3 kb 5'	Fusión α-lactalbúmina humana con calcitonina de salmón	Conejo	1-2,1 mg/ml	McKee <i>et al.</i> , 1998
β-lactoglobulina-oveja	4,3 kb 5'; 2,5 kb 3'	ADNg de las cadenas α,β y γ del fibrinógeno humano	Ratón	Hasta 2 mg/ml (subunidades)	Prunkard <i>et al.</i> , 1996
β-caseína-rata	3,5 kb 5'; 3 kb 3'	β-caseína rata	Ratón	0,01-1% ARNm	Lee <i>et al.</i> , 1988

β -caseína-rata	2,3 kb 5'; 5,5 kb 3'	CAT bacteriano	Ratón	endógeno	Lee <i>et al.</i> , 1989
β -caseína-conejo	2 kb 5'	Interleuquina 2 humano	Conejo	Variable	Buhler <i>et al.</i> , 1990
β -caseína-cabra	3 kb 5'; 6 kb 3'	β -caseína cabra	Ratón	430 ng/ml	Persuy <i>et al.</i> , 1992
β -caseína-cabra	4,2 kb 5'; 5,3 kb 3'	β -caseína cabra	Ratón	12-24 mg/ml	Roberts <i>et al.</i> , 1992
β -caseína-cabra	4 kb 5'; 4,5 kb 3'	ADNc CFTR	Ratón	1 mg/ml	DiTullio <i>et al.</i> , 1992
β -caseína-cabra	6,2 kb 5'; 7,1 kb 3'	ADNc κ -caseína bovino	Ratón	NC	Gutierrez <i>et al.</i> , 1995
β -caseína-cabra	3 kb 5'	ADNg κ -caseína cabra	Ratón	0,9-1,5 mg/ml	Persuy <i>et al.</i> , 1995
β -caseína-ovino	16 kb 5'; 8 kb 3' (gen entero)	β -caseína bovino	Ratón	0,02-3 mg/ml	Rijnkels <i>et al.</i> , 1995
β -caseína-ovino	1,79 kb 5'	ADNc lisozima humana	Ratón	<0,1-20 mg/ml	Maga <i>et al.</i> , 1994
β -caseína-ovino	1,72 kb 5'	hGH genómico	Rata	ND	Ninomiya <i>et al.</i> , 1994
α s1-caseína-ovino	1,35 kb 5'; 1,5 kb 3'	ADNc α s1-caseína bovino	Ratón	0,00011 a 10,9 mg/ml	Clarke <i>et al.</i> , 1994
α s1-caseína-ovino	1,35 kb 5'; SV40 3'	CAT bacteriana	Ratón	endógeno	Clarke <i>et al.</i> , 1994
α s1-caseína-ovino	2,9 kb 5'; 3,5 kb 3'	ADNc IGF-1 humano	Conejo	3 ng/mg	Brem <i>et al.</i> , 1994
α s1-caseína-ovino	21 kb 5'; 2 kb 3'	ADNg uroquinasa humano	Ratón	1 mg/ml	Meade <i>et al.</i> , 1990
α s1-caseína-ovino	21 kb 5'; 2 kb 3'	ADNc lisozima humano	Ratón	1-2 mg/ml	Maga <i>et al.</i> , 1994
α s1-caseína-ovino	6,2 o 14,2 kb 5'; 6,5 kb 3'	ADNc lactoferrina humano	Ratón	0,25-0,75 mg/ml	Platenburg <i>et al.</i> , 1994
α s1-caseína-ovino	15 kb 5'; 6 kb 3'	ADNc lactoferrina humano	Vaca	0,1-36 μ g/ml	Krimpenfort <i>et al.</i> , 1991
α s2-caseína-ovino	8 kb 5'; 1,5 kb 3' (gen entero)	α s2-caseína bovino	Ratón	ND	Rijnkels <i>et al.</i> , 1995
κ -caseína-ovino	5 kb 5'; 19 kb 3'	κ -caseína bovino	Ratón	0,1% del ARNm	Rijnkels <i>et al.</i> , 1995
NC: no cuantificado				endógeno	
ND: no detectado				endógeno	

Estudio de la regulación de la expresión del gen de proopiomelanocortina (POMC)

Expresión endócrina y neuronal de POMC

El gen de POMC codifica para un precursor multipéptido capaz de generar una variedad de productos biológicamente activos luego de un complicado procesamiento post-traducciona l específico de tejido. Los corticotropos del lóbulo anterior de la hipófisis y los melanotropos del lóbulo intermedio liberan dos de los péptidos mejor caracterizados: ACTH y la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH), respectivamente. En el cerebro, POMC se expresa en neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo y del núcleo del tracto solitario para producir β endorfina, un potente péptido opioide que estimula preferencialmente a los receptores opioides de tipo μ (Watson *et al.*, 1978; Civelli *et al.*, 1982; Schwartzberg y Nakane, 1983). ACTH, α , β , y γ -MSH y las formas opioides y no opioides de β -endorfina secretadas por estos grupos celulares desarrollan funciones pleiotrópicas en la respuesta adaptativa del organismo al estrés agudo tales como aumentar la disponibilidad de glucosa, elevar el umbral al dolor (analgesia) y postergar la generación de procesos inflamatorios (Watson *et al.*, 1978). En el cerebro, además de β -endorfina, las neuronas de POMC liberan melanocortinas que participan en el control de la alimentación y el ayuno (Fan *et al.*, 1997). Las neuronas hipotalámicas de POMC expresan receptores de leptina (Cheung *et al.*, 1997) y el ayuno inducido por leptina es prevenido por antagonistas de receptores a melanocortinas (Seeley *et al.*, 1997). Además, agonistas del receptor MC-4 reducen el consumo de alimento (Fan *et al.*, 1997), mientras que ratones deficientes en receptores a MC-4 son obesos (Huszar *et al.*, 1997). La desregulación de la expresión del gen de POMC es observable clínicamente en la enfermedad de Cushing como resultado de adenomas hipofisarios hiperproductores de POMC o de tumores neuroendócrinos extrahipofisarios. Durante el desarrollo embrionario la expresión de POMC muestra un patrón espacio-temporal característico (Japón *et al.*, 1994). Al día 10,5 *postcoitum* (e10.5) ya se detecta ARNm de POMC en la base del diencéfalo de ratón, sitio que dará origen al núcleo arcuato del hipotálamo; al día e12.5 se comienza a observar ARNm de POMC en corticotropos de la hipófisis en desarrollo y un día después aparece en el lóbulo intermedio. Esta expresión temprana de POMC sugiere una participación en la ontogenia y

diferenciación de los sistemas nervioso y endócrino relacionados con la respuesta al estrés (Elkabes *et al.*, 1989). Sin embargo, esta hipótesis perdió solidez luego de que la generación de ratones mutantes deficientes en β -endorfina (Rubinstein *et al.*, 1996) o del receptor a melanocortinas MC-4 (Huszar *et al.*, 1997) no mostraron ninguna anomalía durante el desarrollo embrionario.

Estudios transcripcionales del gen de POMC

Experimentos realizados por nuestro grupo en los últimos años demostraron que los requerimientos transcripcionales del gen de POMC a nivel neuronal son diferentes a los necesarios a nivel endócrino (Rubinstein *et al.*, 1993; Young *et al.*, 1998). Nuestro objetivo general es entender porqué un mismo gen sufre una regulación transcripcional distinta en tejidos de origen diverso y nuestra hipótesis de trabajo sugiere que cada tipo celular controlaría la especificidad transcripcional, al menos en parte, mediante mecanismos moleculares independientes.

La disponibilidad de una línea celular de origen corticotrópico, AtT20, permitió que varios grupos lograran avances importantes en el conocimiento de las regiones regulatorias del promotor de POMC. La acumulación de estudios deleciones y mutacionales del promotor de POMC en células AtT20 transfectadas y en ratones transgénicos revela similitudes y diferencias. La región 5' flanqueante contenida entre los nucleótidos -408 y -34 se ha caracterizado en su tercio distal, central y proximal. Deleciones sucesivas de esas regiones resultan en una pérdida gradual de la actividad promotora en células AtT20, aunque aún la región comprendida por los nucleótidos -43 al +64 mantiene algún nivel de actividad. Therrien *et al.* (1991) sugirieron que combinaciones de elementos en los dominios distal y central son importantes para la expresión específica de POMC en la hipófisis. Sin embargo, datos obtenidos en ratones transgénicos son consistentes con un importante rol de los dominios proximal y central para la determinación de la expresión específica en hipófisis (Liu *et al.*, 1992). Entre las diferencias encontradas en estudios *in vitro* e *in vivo* se incluye la observación de Riegel *et al.* (1990), quienes sugieren que un sitio ubicado en la posición -15 a -3 del gen de POMC contribuye a la actividad basal del gen en células AtT20. Estudios en ratones transgénicos mostraron, sin embargo, que el reemplazo de esta región por el promotor

viral de la timidina kinasa no modifica la expresión célula-específica de POMC en la hipófisis (Liu *et al.*, 1992).

Estudios de interacción entre el promotor de POMC con proteínas presentes en extractos nucleares de células AtT20 permitieron caracterizar la inhibición transcripcional de este gen mediada por glucocorticoides. La unión del receptor de glucocorticoides en la posición -60 fue identificada como el elemento de respuesta negativa a glucocorticoides (nGRE; Charron y Drouin, 1986; Drouin *et al.*, 1989). La unión del receptor de glucocorticoides al nGRE tiene propiedades particulares, ya que la estructura del receptor es homotrimérica y resulta de la unión de un homodímero a un lado del ADN y la posterior unión de otro monómero al lado opuesto (Drouin *et al.*, 1993). También parece haber múltiples elementos responsables de la activación por el factor estimulante corticotrófico (CRH) en el promotor de POMC. No obstante, ninguno de ellos parece ser el clásico elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE), TGACGTCA, que une a la proteína CREB. Utilizando deleciones secuenciales en la región 5' del promotor de POMC de rata, Roberts *et al.* (1987) localizaron un elemento que confiere inducibilidad a CRH sin alterar la expresión basal, en la región comprendida entre los nucleótidos -263 y -133. Más tarde identificaron un factor presente en extractos de células AtT20 que se unía a este elemento en respuesta a la inducción por CRH (Jin *et al.*, 1994). Utilizando ensayos de protección a DNasas se identificaron sitios de unión a AP-1 y AP-2 en la región comprendida entre los nucleótidos -141 y -106 del promotor murino, homóloga a la región -169 / -134 del gen de rata (Bishop *et al.*, 1990). También fue descrito un sitio consenso de unión al factor AP-1, TGACTCA, centrado en el nucleótido +43 del exón 1 (Boutillier *et al.*, 1995; Riegel *et al.*, 1991), pero igual que el sitio de unión a PO-B localizado entre la TATA box y el sitio de iniciación de la transcripción (Riegel *et al.*, 1990), parece ser dispensable para la expresión regulable por hormonas y célula-específica en ratones transgénicos (Liu *et al.*, 1992). Más recientemente fueron identificados dos sitios de unión al factor SP1 y un sitio de unión a un factor aún no identificado denominado PPI (putative pituitary POMC1). Estudios en animales transgénicos demostraron que la unión del factor PPI es requerida para la expresión célula específica de POMC en la hipófisis, mientras que el rol de SP1 parece ser menos importante. PPI fue encontrado únicamente en células que expresan POMC (Liu *et*

al.,1995). Recientemente se propuso la existencia de otros factores de transcripción que interactuarían con el promotor de POMC como CUTE, Brn3.0 y Ptx1. La proteína CUTE (del inglés: *corticotroph upstream transcription element-binding*) se une a secuencias del tipo caja E, de unión a factores *helix loop helix*, en el promotor de POMC (Therrien y Drouin, 1993). Sin embargo, estudios en animales transgénicos mostraron que el CUTE no es requerido para la expresión correcta de los transgenes (Liu *et al.*,1992; Liu *et al.*,1995). Brn-3.0 pertenece a la familia de factores de dominios POU. Se expresa en células AtT20 y se une a una región necesaria para la expresión célula específica de POMC, aunque su significancia funcional no está clara (Guerrero *et al.*,1993). Que un factor POU se una al promotor de POMC es interesante ya que un miembro de esa familia de factores de transcripción, Pit-1, controla la proliferación y diferenciación de tres tipos celulares de la hipófisis anterior (lactotrofos, tirotrofos y somatotrofos) y funciona como activador transcripcional de los genes de hormona de crecimiento y de prolactina (Li *et al.*,1990). Sin embargo, el sitio de unión a Brn-3.0 puede ser eliminado del promotor de POMC sin perder la expresión hipofisaria específica en ratones transgénicos (Liu *et al.*,1995). Más tarde fue identificado Ptx1 (pituitary homeo box 1), una homeoproteína relacionada con los genes bicoid y orthodenticle de *Drosophila melanogaster*, y Otx-1 y Otx-2 en mamíferos (Lamonerie *et al.*,1996). Ptx1 activa la transcripción uniéndose a una secuencia del gen de POMC relacionada con los sitios de unión de bicoid en *Drosophila melanogaster* (Lamonerie *et al.*,1996). Como es expresado en todas las células del bolsillo de Rathke (primordio de la hipófisis) y su expresión es muy temprana, los autores proponen que interviene en el desarrollo de la glándula y que posteriormente los corticotrofos lo reclutan para regular la expresión célula específica del gen de POMC. En 1997 Poulin *et al.* demostraron que CUTE era un complejo proteico que contenía NeuroD1 asociado a otros factores ubicuos del tipo *helix loop helix* y que actuaba sinérgicamente con Ptx1 en la expresión célula específica de POMC.

Regulación de la expresión neuronal del gen de POMC

Los mecanismos que controlan la expresión de genes en el sistema nervioso central (SNC) son muy poco conocidos en comparación con aquellos que se expresan en tejidos

periféricos. Esto es debido, en parte, a la falta de líneas celulares neuronales de fenotipos definidos. Estudios anteriores mostraron que en 7 líneas independientes de ratones transgénicos portadores de 4 kb del promotor de POMC de rata fusionado al gen lacZ, la expresión de β -galactosidasa resultó adecuada en melanotrofos y corticotrofos hipofisarios pero nunca se observó su expresión en el núcleo arcuato del hipotálamo (Rubinstein *et al.*, 1993). La falta de expresión en neuronas del núcleo arcuato a partir de este transgén sugiere la existencia de un elemento específico para neuronas en una región diferente del gen de POMC. Esto fue confirmado con la producción de 6 líneas de ratones transgénicos con un clon genómico de POMC de 10.2 kb, conteniendo la unidad transcripcional completa y 2 kb flanqueantes a ambos lados, marcado por la inserción de un oligonucleótido dentro del tercer exón (HAL*). Ensayos de hibridización *in situ* en secciones seriadas de cerebro e hipófisis mostraron que la expresión de HAL* en cada una de las 6 líneas estuvo limitada a la hipófisis y ausente en el hipotálamo (Rubinstein *et al.*, 1993). Estos datos sugieren que la expresión neuronal auténtica de POMC requiere de, por lo menos, un elemento distal adicional que no es necesario para la expresión célula-específica en la hipófisis. Existen distintos ejemplos en donde *enhancers* tejido-específicos dentro de un mismo gen son responsables de dirigir la expresión a tipos celulares distintos, como el gen de glucagon (Lee *et al.*, 1992), apolipoproteína E (Simonet *et al.*, 1991) y la subunidad α de la hormona glicoproteica (Hamernik *et al.*, 1992).

Recientemente nuestro laboratorio ha producido ratones transgénicos con un fragmento genómico de 27 kb del gen de POMC. Por primera vez logramos observar una expresión auténtica de un transgén de POMC en el SNC, tanto en el núcleo arcuato del hipotálamo como en el núcleo del tracto solitario (Young *et al.*, 1998). Esta observación se realizó en tres líneas de ratones transgénicos independientes. En este mismo estudio demostramos que el elemento neuronal específico de POMC (nPOMC) está localizado en regiones 5' distales del promotor. Contamos, entonces, con la posibilidad de dirigir la expresión de transgenes a neuronas de POMC hipotalámicas y así generar modelos animales para el estudio de la fisiología del dolor/analgesia, de la alimentación y de la reproducción y para poder identificar al gen maestro que controla la diferenciación de neuronas endorfinérgicas. En este trabajo desarrollamos una estrategia que nos permitirá, por un

lado, continuar con el análisis delecional de POMC y así lograr acotar la ubicación del elemento nPOMC a 4 kb, y por otro, generar herramientas para producir una línea celular de tipo neuronal que exprese POMC. El objetivo de nuestro laboratorio a largo plazo es identificar y aislar el factor transcripcional involucrado en la expresión neuronal de POMC.

Esta estrategia está basada en el direccionamiento de genes heterólogos a neuronas del núcleo arcuato que expresen POMC, utilizando genes reporteros para el análisis delecional y oncogenes para generar la línea celular de tipo neuronal.

Direccionamiento de genes heterólogos a neuronas del núcleo arcuato que expresan POMC

Hay muy pocos ejemplos de direccionamiento preciso de genes heterólogos a neuronas del SNC. Un ejemplo exitoso lo constituye las neuronas de GnRH. En este caso, el promotor de GnRH, muy bien caracterizado (Mason *et al.*, 1986; Whyte *et al.*, 1995), fue utilizado para dirigir la expresión del antígeno T del virus SV40, y así generar líneas inmortales, para expresar luciferasa como gen reportero (Mellon *et al.*, 1990) y, recientemente, para dirigir la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP; del inglés *green fluorescent protein*; Spergel *et al.*, 1999).

Nuestro laboratorio, como se ha mencionado anteriormente, ha sido el primero en dirigir la expresión de transgenes conteniendo un fragmento genómico del gen de POMC de ratón a neuronas de POMC de ratones transgénicos (Young *et al.*, 1998). En estos experimentos se ha determinado que una región comprendida entre -2 y -13 kb del inicio de transcripción contiene el elemento nPOMC. Por lo tanto, utilizando estas secuencias sería posible dirigir la expresión de genes heterólogos a neuronas de POMC y abre numerosas puertas para que sean investigadas en un futuro.

Por ejemplo, el direccionamiento de proteínas fluorescentes permitirá obtener registros fisiológicos de neuronas de POMC fácilmente identificables en cortes de hipotálamo, tal cual se lograron obtener en neuronas de GnRH (Spergel *et al.*, 1999).

En un principio se pretende desarrollar una estrategia para direccionar la expresión de proteínas fluorescentes a neuronas de POMC y avanzar en el análisis delecional de nPOMC a una resolución de 4kb. Esta estrategia nos permitiría obtener resultados a muy

corto plazo y en forma mucho más simple en comparación a lo que se realizaba anteriormente.

Hasta el momento, el análisis de los animales transgénicos se realizaba mediante hibridaciones *in situ* (Young et al., 1988). La estrategia desarrollada por nuestro laboratorio consistía en utilizar un set de 3 oligonucleótidos específicos que hibridaban contra distintas zonas del mensajero transgénico y el gen endógeno (figura 2).

El primero, dirigido al exón 2 de POMC (E2-POMC), detecta tanto ARNm transgénico como no transgénico. El segundo, 553-TG, está dirigido contra un oligo heterólogo insertado en el exón 3 de los transgenes. Por lo tanto, sólo detecta ARNm transgénico. El tercero, E3-POMC, hibridiza con las secuencias flanqueantes al oligo insertado. Por lo tanto, detecta muy eficientemente el ARNm transcripto a partir del gen endógeno, y en forma muy ineficiente el ARNm transcripto a partir de los transgenes.

Esta estrategia utilizada por varios años, si bien resultaba muy eficiente, era muy costosa en tiempo. Una hibridación *in situ* requiere, aproximadamente, entre 3 y 4 semanas de exposición. Para agilizar la tarea, aprovechando las poderosas herramientas existentes hoy en el área de genes reporteros, hemos decidido desarrollar un sistema que nos permite analizar los patrones de expresión a medida que se van desarrollando los cortes del material.

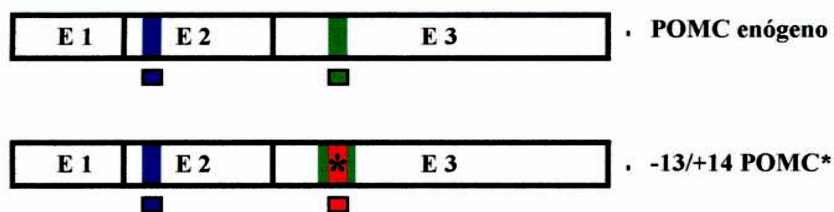


Figura 2 . Estrategia de hibridación utilizada para revelar los mensajeros de POMC mediante sondas de oligonucleótidos. La hibridación *in situ* se realizaba utilizando los oligonucleótidos E2-POMC (cuadrado azul), E3-POMC (cuadrado verde) y 553-TG (cuadrado rojo); que hibridizan con secuencias pertenecientes a los mensajeros de POMC (E2-POMC y E3-POMC) y de POMC27* (E2-POMC y 553-TG). Las cajas blancas rotuladas E1, E2 y E3 representan los exones del gen de POMC, las zonas coloreadas indican las secuencias reconocidas por las sondas. El óvalo rojo con asterisco representa el oligonucleótido de 30 pb insertado en el exón 3.

El gen reportero fluorescente más utilizado es el de la GFP de la medusa *Aequorea victoria*. La proteína codificada por este gen fue descubierta por Shimomura *et al.* (1962). Sin embargo, permaneció en la oscuridad durante mucho tiempo. Recién en los últimos tres años pasó a ser una de las proteínas más estudiadas en bioquímica y biología celular. La GFP se caracteriza por generar un fluoróforo de emisión interno muy visible y sumamente eficiente, lo que la hace que sea considerada fascinante, y a la vez tremendamente valiosa como herramienta para la investigación. Como reportero se emplea para monitorear la expresión de genes y localizar proteínas *in vivo*, *in situ* y en tiempo real (Chalfie *et al.*, 1994; Prasher *et al.*, 1992; Inouye y Tsuji, 1994; Wang y Hazelrigg, 1994).

Con una simple exposición a luz azul o UV, la GFP emite fluorescencia verde, contrariamente a lo que ocurre con otros reporteros bioluminiscentes que para emitir luz requieren en forma adicional otras proteínas, cofactores o sustratos.

A pesar que se requiere la GFP intacta para emitir fluorescencia, el cromóforo activo es un tripéptido determinado por la secuencia primaria de aminoácidos (Cody *et al.*, 1993). La formación del cromóforo es dependiente de oxígeno y ocurre en forma gradual luego de la traducción (Inouye y Tsuji, 1994). Por otro lado, la fluorescencia emitida parece no depender de un proceso enzimático (Heim *et al.*, 1994). También, la fluorescencia emitida por GFP es estable, especie independiente y puede ser monitoreada en células vivas en forma no invasiva. Por otro lado, resiste la fijación con formaldehído y puede ser empleada en experimentos de colocalización.

La GFP *wild type* tiene un pico máximo de excitación en 395 nm y un pico máximo de emisión en 508 nm. En la actualidad se han generado numerosas variantes de GFP en diferentes laboratorios (Yang *et al.*, 1996; Cormack *et al.*, 1996; Crameri *et al.*, 1996). Una de ellas, la EGFP (del inglés: *enhanced green fluorescent protein*; Yang *et al.*, 1996) comercializada por Clontech Laboratories (Palo Alto, CA), tiene un pico único de excitación de 488 nm, desplazado hacia el rojo con respecto a la proteína *wild type*. Por otro lado, fluoresce aproximadamente 35 veces más que la GFP *wild type* a 488 nm (Haas *et al.*, 1996), debido a un incremento en el coeficiente de extinción. Para asegurar una máxima expresión en mamíferos, la EGFP también contiene 190 mutaciones silenciosas que corresponden a las preferencias por el uso de codones en humanos (Haas *et al.*,

1996). Por lo tanto, el cambio hacia el rojo y el aumento de expresión de EGFP convierte a esta proteína en una reportera ideal para utilizarse en experimentos de microscopía de fluorescencia y *fluorescence activated cell sorting* (FACS; Yang *et al.*, 1996; Galbraith *et al.*, 1995).

Para realizar el análisis delecional de las secuencias 5' flanqueantes de POMC se insertará el gen EGFP en el sitio de restricción Stu I ubicado en el exón 2 de POMC, previo al ATG que demarca el inicio de la traducción. Con los transgenes construidos se producirán líneas de animales transgénicos que serán evaluadas para determinar expresión hipotalámica de EGFP por microscopía de fluorescencia y ubicar el elemento nPOMC con una resolución de 4kb.

En futuros trabajos se intentará con la misma estrategia localizar nPOMC a resolución de 2 kb, también analizando la expresión de EGFP en animales transgénicos.

Sin embargo, para lograr aislar completamente el elemento nPOMC actuante en *cis* y los factores de transcripción necesarios para activar la transcripción de POMC, es necesario la utilización de una línea neuronal de núcleo arcuato que a su vez exprese POMC. Esta línea celular no ha sido generada hasta el momento.

Inicialmente, las líneas celulares eran obtenidas solamente como células tumorales o variantes inmortalizadas espontáneamente que crecían en cultivo. (Darnel *et al.*, 1986). Con el avance de las técnicas de biología molecular se empezaron a generar líneas celulares con la inserción de genes capaces de producir inmortalización celular mediante transfecciones celulares o utilización de vectores retrovirales. (Glover, 1987; Jat y Sharp, 1986; Frederiksen *et al.*, 1988; Bayley *et al.*, 1988; Birren y Anderson, 1990; Burns *et al.*, 1989; Evrard *et al.*, 1988; Lemoine *et al.*, 1989; Santerre *et al.*, 1981; Williams *et al.*, 1988). Sin embargo, para que la transfección sea eficiente se requiere un gran número de células blanco, para asegurar que el gen inmortalizador sea integrado en forma estable y en una posición adecuada para su expresión dentro del genoma. Con la utilización de vectores virales es posible transfectar un bajo número de células blanco mediante cocultivo con células productoras del virus. Sin embargo, esta última estrategia no evita que las células blanco tengan que atravesar períodos de división celular para lograr la intergración del gen deseado. Aún más, ambas tecnologías requieren que las células sean capaces de crecer en cultivo por períodos largos de tiempo, para obtener un sustancial

número de ellas que expresen el gen inmortalizador. Otro problema radica en que células idénticas pueden tener diferentes sitios de integración y, consecuentemente, distintos niveles de expresión del gen inmortalizador lo que podría llevar aparejado un distinto comportamiento.

En núcleo arcuato hay varios tipos celulares, dentro de los cuales se encuentran las neuronas endorfinérgicas, que en total son solamente 3000. Por lo tanto, la complejidad de nuestro caso es evidente y, a priori, no sería posible generar una línea neuronal con las técnicas convencionales descritas anteriormente.

Una alternativa ampliamente utilizada para generar líneas celulares consiste en la generación de animales transgénicos. Mediante oncogénesis dirigida es posible aislar clones inmortalizados del tipo celular deseado evitando los problemas mencionados anteriormente.

Considerando que nuestro laboratorio posee las herramientas moleculares necesarias para direccionar la expresión de genes en forma precisa a neuronas de POMC del núcleo arcuato, intentaremos construir nuestra propia línea celular mediante la generación de animales transgénicos. La estrategia consiste en inmortalizar neuronas de POMC mediante oncogénesis dirigida con el antígeno T largo (AgT) del virus SV40, que tiene la propiedad de ser transformante debido a que interfiere en la regulación del ciclo celular bloqueando el control de la proteína p53.

La construcción de transgenes conteniendo el gen del AgT bajo el control transcripcional de promotores específicos ha servido principalmente para direccionar la formación de tumores a determinados tipos celulares en ratones transgénicos. En algunos casos se lograron aislar líneas celulares a partir de dichos tumores. Por ejemplo, Low *et al.* (1993) obtuvieron ratones con tumores del lóbulo intermedio hipofisario utilizando 706 pb del promotor de POMC de rata fusionado a la unidad transcripcional del AgT. Posteriormente, a partir de estos tumores se aisló una línea celular de melanotrofos y otra productora del factor regulador de la prolactina (Hnasko *et al.*, 1997).

Un problema común radica en que, a pesar que los tumores se originan solamente a partir del tipo celular donde es dirigida la expresión del AgT, generalmente se pierden los marcadores típicos de diferenciación, porque estas células progresan a estadios de indiferenciación. Esto determinaría que las líneas aisladas no sirvan como fuente de

factores de transcripción que activen los genes a estudiar, haciéndolas inútiles considerando nuestros objetivos. Este problema puede evitarse con el uso de genes inmortalizadores condicionales. Por ejemplo, la variante termosensible (tsA58) del gen del AgT del virus SV40 produce una proteína termolábil a temperaturas por encima de los 38,5 °C (Cairns *et al.*, 1994). Esta ventaja permite realizar cultivos primarios que pueden mantenerse en condiciones permisivas a 33,5 °C hasta seleccionarse una línea celular inmortal. Luego estas células pueden ser incubadas en condiciones no permisivas y así perder su capacidad proliferativa y recuperar su estado de diferenciación. Esta estrategia ha sido exitosa en la generación de numerosas líneas transgénicas. Entre ellas se pueden nombrar líneas celulares de progenitores eritroides (Cairns *et al.*, 1994), epiteliales de colon e intestino (Whitchead *et al.*, 1993), osteoclastogénicas (Chambers *et al.*, 1993), neuro-endócrinas adrenales (Cairns *et al.*, 1997), gliales (Bronstein *et al.*, 1998), de la granulosa (Walther *et al.*, 1999), etc.

Con respecto al SNC, por transfecciones con el gen del AgT o generación de animales transgénicos se han aislado exitosamente líneas celulares de astroglia (Galiana *et al.*, 1990), de astrocitos (Kitamura *et al.*, 1997) y células de Schwann (Thi *et al.*, 1998). También se ha logrado establecer líneas neuronales hipotalámicas que expresan GnRH (Mellon *et al.*, 1990), neuronales de retina (Hammang *et al.*, 1990) y de neuronas amigdalares (Mulchahey *et al.*, 1999).

En este trabajo desarrollaremos una estrategia para generar animales transgénicos con tumores hipotalámicos. Estos se caracterizarán mediante la utilización de marcadores neuronales para, en un futuro, intentar aislar la línea neuronal que nos permita aislar completamente el elemento nPOMC y factores transcripcionales necesarios para activar la transcripción de POMC.

OBJETIVOS

- Poner a punto las distintas etapas necesarias para producir ratones transgénicos mediante la microinyección pronuclear de fragmentos de ADN.
- Identificar las regiones 5'flanqueantes del gen de β -caseína capaces de dirigir selectivamente la expresión de genes heterólogos a células epiteliales de la glándula mamaria en modelos de ratones transgénicos.
- Utilizar los modelos de ratones transgénicos generados para evaluar la penetrancia y potencia de las secuencias flanqueantes estudiadas.
- Determinar la capacidad de procesamiento post traduccional de proteínas heterólogas que posee la glándula mamaria.
- Determinar, en base a los resultados obtenidos en los puntos previos, si es factible el uso de las secuencias 5'flanqueantes estudiadas, para la utilización de la glándula mamaria de animales de granja como bioreactores productores de proteínas humanas de interés farmacéutico.
- Avanzar con el análisis delecional del elemento nPOMC, responsable de la expresión neuronal del gen de POMC, mediante la generación de ratones transgénicos (actualmente el único método posible). Durante este trabajo se pretende acotar la ubicación del elemento mencionado a una resolución de 4 kb.
- Desarrollar un sistema rápido y eficiente para realizar el análisis delecional de POMC. Se pretende usar la tecnología de las proteínas fluorescentes que nos permitiría analizar rápidamente los animales transgénicos sin la necesidad de recurrir a *hibridaciones in situ*.

- Empezar a generar herramientas para, en un futuro, generar una línea celular de neuronas endorfinérgicas del núcleo arcuato que nos permita aislar el elemento nPOMC y los factores de transcripción con los que interactúa. Proponemos producir un modelo de ratón transgénico que exprese un el oncogén AgT tsA58. El promotor de 13 kb de POMC será utilizado para dirigir la expresión de la variante termosensible tsA58 de la proteína transformante antígeno T del virus SV40 a neuronas hipotalámicas de POMC. El objetivo es inmortalizar neuronas de POMC, la primera etapa para producir la línea celular deseada.

MATERIALES Y METODOS

Técnicas de biología molecular empleadas para la construcción de los transgenes

Cortes con enzimas de restricción y aislamiento por electroelución

La preparación de fragmentos para futuras reacciones de ligación y vectores portadores de los mismos, se realizan mediante cortes con enzimas de restricción de acuerdo a las instrucciones del proveedor, partiendo como mínimo de 5 µg y máximo de 20 µg del fragmento deseado o vector, y posterior electroelución en geles de agarosa.

El aislamiento por electroelución de fragmentos y vectores se lleva a cabo mediante una electroforesis preparativa del ADN digerido, en geles de agarosa con 0,1 µg/µl de bromuro de etidio, utilizando TBE 0,5X (45 mM Tris borato, 1 mM EDTA, pH 8) como buffer de corrida. Luego de efectuada la separación, se identifican las bandas con un transiluminador de UV y se corta, con una hoja de afeitar, el bloque de agarosa conteniendo la banda deseada. Este se coloca dentro de un tubo de diálisis de 0,25 pulgadas de diámetro (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) con buffer TBE 0,5 X, se cierran los bordes con agarraderas y se realiza una electroforesis, también en TBE 0,5 X, orientando la membrana de forma tal que el campo eléctrico generado sea perpendicular a la longitud máxima de la bolsa de diálisis. La electroforesis se realiza durante 30 min a 10–12 V/cm; luego se extrae el medio líquido, se le hace una extracción con 1 vol de fenol equilibrado con Tris-HCl, pH 8–cloroformo–isoamílico 25:24:1 (PIC), seguida de una extracción con 1 vol cloroformo–isoamílico 24:1 (IC), y se precipita la fase acuosa con 0,1 vol de acetato de sodio 3 M, pH, 5,2, y 2,5 vol de etanol 100 %. Se mantiene a –70 °C durante 10 min y se centrifuga a máxima velocidad durante 10 min. Se lava el pellet con etanol 70% y se resuspende en 10–20 µl de TE de acuerdo a la masa inicial.

Generación de extremos romos

Para generar extremos romos o *blunt*, a partir de cortes con enzimas que dejan extremos protruyentes, se utiliza la enzima Klenow (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). En el caso de extremos 5' protruyentes, se hacen reacciones de rellenado o *fill in*, utilizando la actividad polimerasa de la Klenow, como se especifica a continuación. En un tubo *ependorf* se

agrega 0.5–1 µg de ADN con los extremos 5' protruyentes, 0,5 mM de cada dNTP, el buffer apropiado y 1 U de Klenow. Se lleva a 30 µl con H₂O y se incuba 15 min a temperatura ambiente. La reacción se termina por extracción con un vol PIC. Se incuba por 5 min a temperatura ambiente y se centrifuga a máxima velocidad. Se toma la fase acuosa y, para eliminar trazas de fenol, se hace una extracción con 1 vol de IC. Nuevamente, se vuelve a centrifugar a máxima velocidad por 1 min y se toma la fase acuosa. El ADN se precipita agregando 0,1 vol de una solución 3 M acetato de sodio, pH 5,2, y 2,5 vol de etanol 100%. Luego de enfriar por 10 min a –70 °C se centrifuga a máxima velocidad, se lava el pellet con etanol 70% y se resuspende en TE (10 mM Tris–HCl, pH 8, 1 mM EDTA). En el caso de extremos 3' protruyentes, se digieren las colas simple cadena utilizando la actividad 3'→5' exonucleasa de la enzima Klenow, como se detalla a continuación. En un tubo *ependorf* se agrega 0.5–1 µg de ADN con los extremos 3' protruyentes, el buffer apropiado y 5 U de Klenow. Se lleva a 30 µl con H₂O y se incuba 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se termina la reacción y se precipita el ADN de la misma forma que para los extremos 5' protruyentes.

Defosforilación de vectores

Las reacciones de defosforilación se realizan con la enzima fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIAP) de Gibco BRL (Gaithersburg, MD), incubando en el buffer provisto por el proveedor, 0,01 U de CIAP por pmol de ADN con extremos 5' protruyentes, a 37 °C durante 30 min, o 1 U de enzima por pmol de ADN con extremos romos, a 50 °C por una hora. La inactivación de la CIAP se realiza por medio de una doble extracción con un vol de PIC. Posteriormente se eliminan trazas de fenol y se precipita el ADN como se especifica anteriormente.

Reacciones de ligación

Para realizar las reacciones de ligación, se utilizan 20 a 50 µg de vector. El inserto se agrega en una proporción molar, con respecto al vector, de 3:1 (estas proporciones se calibran corriendo previamente un gel de agarosa). La mezcla de vector e inserto se incuba con 1 U de la ligasa de ADN del fago T4 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) en el buffer de ligación provisto, que contiene ATP, en un volumen final de 10 µl. Los tubos se

incubaban *overnight* a temperatura ambiente y luego se procede a realizar la transformación de bacterias competentes.

Preparación de bacterias competentes

Partiendo de un stock de glicerol de la cepa DH5 α de *E. Coli*, se obtienen colonias independientes. Con una de estas colonias se realiza un inóculo en 3 ml de medio LB (1% bactotripton, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl) y se crece a 37 °C con agitación hasta alcanzar una OD₅₅₀ de 0,3. Con este cultivo se inoculan 100 ml de medio LB y se crece con agitación a 37 °C hasta alcanzar una OD₅₅₀ de 0,48. El cultivo se enfría en hielo y se centrifuga a 3000 rpm en rotor GSA durante 5 min a 4 °C. El medio se descarta y el pellet se resuspende cuidadosamente en hielo con 40 ml de Tfb I (30 mM acetato de potasio, 100 mM de KCl, 10 mM de CaCl₂, 50 mM de MnCl₂ y 15% glicerol, ajustado a pH 5,8 con ácido acético 0,2 M). Se deja reposar brevemente en hielo y se centrifugan en tubos tipo corex de 30 ml, nuevamente a 3000 rpm por 5 min a 4 °C. El pellet se resuspende cuidadosamente en hielo con 4 ml de Tfb II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15% glicerol, ajustado a pH 6.5 con 1 M KOH) y luego, las células se reposan en hielo por 15 min. Posteriormente, se alicuotan en tubos *ependorf* y se guardan a -70 °C.

Transformación de células competentes

Las bacterias competentes se descongelan en hielo y se alicuotan de a 50 μ l en tubos *ependorf* estériles. Se agregan 5 μ l del producto de la ligación y, sin sacar las bacterias del hielo, se mezcla suavemente con una punta de pipeta estéril. Las células se dejan reposar en hielo por 45 min y luego se procede a realizar un shock térmico, que consiste en colocar las bacterias a 42 °C durante 90 seg y luego enfriarlas en hielo rápidamente. Las bacterias se recuperan con 1 ml de LB fresco durante una hora, con agitación y a 37 °C. Posteriormente, se centrifugan a 3000 rpm durante 5 min, se descarta el medio y se resuspenden en 100 μ l de LB fresco. Las células recuperadas se plaquean en medio LB ágar con 50 μ g/ μ l de ampicilina y se incuban al menos 16 hs a 37 °C.

Identificación de colonias con el producto de ligación deseado

Para identificar las colonias que llevan el producto de ligación deseado, se procede a realizar un inóculo de 3 ml de medio LB, 50 µg/ml de ampicilina, con las colonias crecidas a partir de la transformación. El cultivo se crece overnight a 37 °C y luego se procede a aislar ADN plasmídico de los mismos como se describe a continuación. Se reparten los 3 ml de cultivo en 2 tubos *ependorf* y las bacterias se centrifugan durante 30 seg a máxima velocidad. Ambos pellets se resuspenden en 200 µl de solución P1 (25 mM Tris, pH 8, 10 mM EDTA, 0,1 mg/ml de RNAsa A). Luego se agrega 200 µl de solución P2 (0,2 N NaOH, 1% SDS), se mezcla suavemente por inversión, seguido de otros 200 µl de solución P3 (acetato de potasio 3 M, pH 8), que también se mezcla por inversión. Los tubos se centrifugan a máxima velocidad durante 10 min. Se toma el sobrenadante y se hace una extracción con 1 vol de PIC seguid de una extracción con 1 vol de IC. La fase acuosa se precipita con 0,8 vol de 2-propanol, se deja reposar 5 min a temperatura ambiente y se centrifuga a 14000 rpm durante 10 min. El pellet se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en 40 µl de TE.

La identificación de las construcciones deseadas se realiza mediante cortes con enzimas de restricción, como se detalla más arriba, y visualización en geles de agarosa con bromuro de etidio.

Obtención y construcción de transgenes

Obtención de un transgén conteniendo secuencias 5'flanqueantes del gen de metalotioneína y la región estructural del gen hGH

El plásmido pXGH5 que contiene secuencias 5'flanqueantes del gen de metalotioneína de ratón (mMT-I) fusionadas a las secuencias codificantes completas del gen de hormona de crecimiento humana (hGH) fue adquirido a Nichols Institute (San Juan Capistrano, CA).

Construcción de un transgén conteniendo secuencias 5'flanqueantes del gen de β -caseína y la región estructural del gen hGH

El transgén 3,8b β cas-hGH contiene 3,8 kb de las secuencias 5'flanquantes del gen de β -caseína bovino, fusionadas a las secuencias codificantes completas del gen de la hormona de crecimiento humana (hGH, ver figura 9).

La construcción del plásmido p3,8b β cas-hGH, albergando el transgén mencionado anteriormente, se realizó como se detalla a continuación:

1. El gen hGH completo se obtuvo del plásmido pOGH (Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA), mediante una doble digestión con *SalI/EcoRI*. El fragmento de 2.15 kb obtenido, conteniendo la unidad transcripcional completa, se subclonó en un vector pBS sin el sitio de restricción *BamHI*, previamente abierto con las enzimas *SalI/EcoRI*, para generar el plásmido pBS/hGH.
2. Se aisló el fragmento de 3,8 kb de la región 5'flanqueante del gen bovino de β -caseína del plásmido p3611/CAT (Schmidhauser *et al.*, 1990; gentilmente cedido por Connie Myers), con las enzimas de restricción *BamHI/SalI*. El fragmento, que además de 3,8 kb de la región 5'flanqueante contiene el sitio de inicio de la transcripción y 40 pb del 1^{er} exón del gen bovino de β -caseína, se subclonó en el plásmido pBS/hGH abierto con las enzimas *BamHI/SalI* para generar el plásmido p3,8b β cas-hGH.

Construcción de transgenes conteniendo secuencias flanqueantes y codificantes de POMC con un cassette de EGFP

Los transgenes -13/+8POMC-EGFP, -9/+8POMC-EGFP y -5/+8POMC-EGFP, contienen fragmentos genómicos del gen de POMC que abarcan: 13, 9 y 5 kb, respectivamente, de las secuencias 5'flanqueantes, la unidad transcripcional completa y 2 kb de la región 3'flanqueante, y una inserción de un cassette de EGFP, conjuntamente con secuencias de poliadenilación de SV40, en el exón 2, previo al inicio de traducción de POMC.

La construcción de plásmidos p-13/+8POMC-EGFP, p-9/+8POMC-EGFP y p-5/+8POMC-EGFP para realizar los análisis delecionales se realizó como se detalla a continuación.

1. Se construyó el plásmido pBS/SV40, insertando en el vector pBS, abierto con *Bam*HI/*Xba*I, un fragmento *Bam*HI/*Xba*I de 300 pb del plásmido pBbpolyA (gentilmente cedido por Connie Myers). Este fragmento abarca la región entre las bases 2533 y 2770 del genoma de SV40 (GenBank, Acceso # J02400), con sitios de poliadenilación que funcionan en ambas direcciones.
2. Se liberó un fragmento de 0.8 kb del plásmido pEGFP-1 (Clontech, Palo Alto, CA), que contiene las secuencias de la proteína verde fluorescente en su versión mamiferizada (EGFP), con las enzimas de restricción *Sma*I/*Not*I. Posteriormente, se realizó una reacción de rellenado sobre este fragmento con la enzima Klenow, para convertir el extremo 5' protruyente dejado por el corte con *Not*I, en un extremo romo. El fragmento resultante se insertó en el plásmido pBS/SV40, abierto con la enzima *Sma*I y defosforilado por acción de la enzima fosfatasa alcalina. La orientación correcta se obtuvo mediante análisis de restricción y se llamó a este plásmido pBS/EGFP-SV40.
3. Se generó un sitio de corte para *Nhe*I en el sitio de policlonado del vector pBS, cortando con *Hind*III, rellenando los extremos protruyentes con Klenow y religando. El vector obtenido se abrió con las enzimas *Nhe*I y *Kpn*I, y se le insertó un fragmento del gen de POMC de 2,35 kb, también liberado con *Nhe*I y *Kpn*I, del plásmido pHAL (Young *et al.*, 1998; ver figura 19), y que contiene el exón 2 completo, conjuntamente con 1.45 kb y 0.75 kb del intrón 1 y 2, respectivamente. El plásmido generado se llamó pBS/Ex2POMC.
4. El fragmento de 1,1 kb EGFP-SV40 se liberó del plásmido pBS/EGFP-SV40 por doble digestión con *Xba*I/*Sma*I y se hizo una reacción de rellenado del extremo 5' protruyente, dejado por el corte con *Xba*I, con la enzima Klenow. El fragmento con extremos romos se insertó en el plásmido pBS/Ex2POMC, abierto con la enzima *Sma*I y defosforilado con fosfatasa alcalina. La orientación correcta se determinó por análisis de restricción. Este plásmido se llamó pEx2POMC-EGFP.
5. Se generó un vector pBS sin el sitio de clonado para *Kpn*I, cortando con la misma enzima, digiriendo el extremo 3' con Klenow y religando. El plásmido resultante se abrió con *Eco*RI y se le insertó el transgén Hal* de 10 kb, liberado del plásmido pHal* con *Eco*RI, que contiene 6 kb de la unidad transcripcional de POMC más 2 kb de las

regiones flanqueantes (Young *et al.*, 1998; ver figura 19). El plásmido resultante se denominó pHal*/*Kpnless*.

6. El plásmido pEx2POMC–EGFP se cortó con las enzimas *NheI* y *KpnI*, y se aisló el fragmento de 3.45 kb, que contiene parte de los intrones 1 y 2, más el exón 2 de POMC con la inserción de EGFP y secuencias de poly A de SV40. Este fragmento se insertó en el vector pHal*/*Kpnless*, abierto con las enzimas *NheI/KpnI*, y aislado del fragmento de 2.35 kb con el exón 2 y parte de los intrones 1 y 2. El plásmido resultante se llamó pHal*/EGFP.
7. Se cortó pHal*/EGFP con *NotI/SmaI* y se separó del fragmento de 1.25 kb generado, que abarca las secuencias 5'flanqueantes entre –0,75 y –2 kb del sitio de inicio de la transcripción. El vector aislado se ligó a los siguientes fragmentos 5'flanqueantes:
 - 7.1. Un fragmento de aproximadamente 12 kb, que contiene las secuencias 5'flanqueantes de POMC, desde –0,75 hasta aproximadamente –13 kb del inicio de transcripción, proveniente de una digestión total con *NotI* y parcial con *SmaI* del clon cosmidico #13, que fue previamente clonado en el laboratorio a partir de una biblioteca genómica de ratón (Young *et al.*, 1998). El plásmido resultante se denominó p–13/+8POMC–EGFP.
 - 7.2. Un fragmento de aproximadamente 8 kb, que contiene las secuencias 5'flanqueantes de POMC, desde –0,75 hasta –8.75 kb del inicio de transcripción, proveniente de una digestión total con *NotI* y parcial con *SmaI* del clon cosmidico #1, que fue previamente clonado en el laboratorio a partir de una biblioteca genómica de ratón (Young *et al.*, 1998). El plásmido resultante se denominó p–9/+8POMC–EGFP0.
 - 7.3. Un fragmento *NotI/SmaI* de 4.25 kb, que contiene las secuencias 5'flanqueantes de POMC, desde –0,75 hasta –5 kb del inicio de transcripción, proveniente del plásmido pBS/–5kb POMC (construido por inserción del fragmento de 4,25 kb obtenido por digestión *BamHI/SmaI* del clon cosmidico #13 en el vector pBS abierto con *NotI/SmaI*). El plásmido generado se llamó p–5/+8POMC–EGFP.

Construcción de un transgén conteniendo secuencias flanqueantes y codificantes de POMC con un cassette AgT del virus SV40

El transgén -13/+8POMCAgT contiene fragmentos genómicos del gen de POMC que abarcan: 13 kb de las secuencias 5'flanqueantes, la unidad transcripcional completa y 2 kb de la región 3'flanqueante, y una inserción del gen del AgT del virus SV40 en el exón 2, previo al inicio de traducción de POMC (ver figura 29).

La construcción del transgén -13/+8POMC-AgT, se realizó como se detalla a continuación:

1. El plásmido pBS/Ex2POMC se abrió con la enzima *StuI*, que corta sobre el exón 2 de POMC, 16 pb río arriba del inicio de la traducción, y, luego de defosforilarlo con la fosfatasa alcalina, se le insertó un fragmento de 2932 pb, que abarca la zona comprendida entre las bases 2258 (sitio *Apa I*) y 5190 (sitio *StuI*) del genoma del virus SV40 (GenBank, Acceso # J02400), conteniendo el gen completo del AgT con una mutación que le confiere termosensibilidad (tsA58). El plásmido resultante se llamó pBSEx2/AgT.
2. El plásmido pBSEx2/AgT se cortó con las enzimas *NheI* y *KpnI*, y se aisló el fragmento de 5.3 kb, que contiene parte de los intrones 1 y 2, más el exón 2 de POMC con la inserción del gen del AgT de SV40. Este fragmento se insertó en el vector pHal*/*KpnI*less (abierto con las enzimas *NheI/KpnI*, y aislado del fragmento de 2.35 kb con el exón 2 y parte de los intrones 1 y 2. El plásmido resultante se llamó pHal*/AgT.
3. Se cortó pHal*/AgT con *NotI/SmaI* y se separó del fragmento de 1.25 kb generado, que abarca las secuencias 5'flanqueantes entre -0,75 y -2 kb del sitio de inicio de la transcripción. El vector aislado se ligó a un fragmento de aproximadamente 12 kb, que contiene las secuencias 5'flanqueantes de POMC, desde -0,75 hasta aproximadamente -13 kb del inicio de transcripción, proveniente de una digestión total con *NotI* y parcial con *SmaI* del clon cosmidico #13, que fue previamente clonado en el laboratorio a partir de una biblioteca genómica de ratón (Young *et al.*, 1998). El plásmido resultante se denominó p-13/+8POMCAgT.

Preparación de los transgenes para la microinyección pronuclear

Los transgenes a microinyectar se obtuvieron a partir de digestiones de maxipreparaciones de ADN plasmídico. Estas preparaciones se realizan a partir de un cultivo de 500 ml en medio Terrific Broth (1,2% bactotripton, 2,4% extracto de levadura, 0,4% glicerol), en presencia de ampicilina 50 µg/ml, crecido por 20 hs a 37 °C. Una vez saturado, el cultivo se enfría durante 5 min en hielo, se separa en dos mamaderas de 400 ml y se centrifuga en rotor Sorvall GS-3 a 5000 rpm durante 5 min y 4 °C. Luego se descarta el sobrenadante y las células se resuspenden en 50 ml de solución P1 (25 mM Tris, pH 8, 10 mM EDTA, 0,1 mg/ml de RNasa A). Posteriormente, se agregan otros 50 ml de solución P2 (0,2 N NaOH, 1% SDS), se mezcla suavemente por inversión, seguido de otros 50 ml de solución P3 preenfriado (acetato de potasio 3 M, pH 8), también se mezcla por inversión, y se incuba en hielo durante 30 min. Los tubos se centrifugan durante 20 min a 7000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se filtra a través de un embudo con una malla de lana de vidrio. Posteriormente, se precipita el ADN plasmídico con el agregado de 0,7 vol de isopropanol, se deja 20 min a temperatura ambiente y se centrifuga, en dos mamaderas de 250 ml, en rotor Sorvall GSA a 10000 rpm durante 30 min a 4°C. El pellet se lava con etanol 70 %, se deja secar y se resuspende con un total de 8 ml de TE (4 ml por mamadera).

Para obtener una preparación limpia del ADN plasmídico, se realizan dos extracciones en gradiente de CsCl como se detalla a continuación. Al ADN plasmídico resuspendido en TE se le agrega 250 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), y luego una cantidad en peso de CsCl equivalente al peso de la solución de ADN en TE. Se disuelve a 37 °C y se ultracentrifuga a 40000 rpm durante 48 hs en rotor Sorvall T-865.1 a 18 °C. Al finalizar la corrida, la posición de la banda de ADN plasmídico se ubica en el gradiente de CsCl con la ayuda de una lámpara de UV y se extrae cuidadosamente con una pipeta pasteur. El material extraído se mezcla con una solución nueva de TE-CsCl (1 gr de CsCl cada 1 ml de TE) y se vuelve a ultracentrifugar como se explica anteriormente. La banda se extrae nuevamente con pipeta pasteur, se coloca en tubos corex y el bromuro de etidio se elimina mediante extracciones sucesivas de butanol saturado en agua. Luego, la solución de ADN obtenida se coloca en tubos *ependorf* y, para eliminar las sales de cesio, se precipita, al menos dos veces, con 2,5 vol de etanol. El pellet, luego de lavarlo con etanol

70 %, y secarlo, se resuspende en 500 μ l de TE. Finalmente, el ADN se cuantifica por espectrofotometría a 260 nm.

Los transgenes 3,8b β cas-hGH, -13/+8POMC-EGFP, -9/+8POMC-EGFP, -5/+8POMC-EGFP y -13/+8POMCAgT se liberaron de las secuencias plasmídicas con las enzimas *NotI* y *SalI*, mientras que el transgén mMT-I/hGH se liberó cortando con *EcoRI*.

Los transgenes se separan de las secuencias plasmídicas por electroelución, como se especifica anteriormente, y luego de la precipitación, se resuspenden en 400 μ l de solución baja sal (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 1 mM EDTA). Posteriormente, se pasa por una minicolumna de intercambio iónico tipo elutip (Schleicher & Schuell, Keene, NII) y se eluye, de acuerdo a las instrucciones del proveedor, con buffer alta sal (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 M NaCl; 1 mM EDTA). Finalmente, el producto eluido se precipita con 2 vol de etanol 100 %, se centrifuga 10 min a máxima velocidad, se lava con etanol 70 % y se resuspende en TE microinyección (5 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,1 mM EDTA). Se cuantifica por espectofotometría a 260 nm y por gel, y se lleva con el mismo buffer a una concentración de 500 moléculas/pl.

El transgén rMT/ β -gal fue gentilmente cedido por el Dr. Malcom J. Low listo para ser microinyectado.

Producción de animales transgénicos

Animales y bioterio

Las cepas endogámicas necesarias para la obtención de embriones (C57B1/6 y CBA/J) y la cepa exogámica Swiss Webster para la obtención de hembras pseudopreñadas se encuentran en una sala exclusiva del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). En esta sala, los animales se mantienen con un sistema de ventilación permanente, un ciclo luz/oscuridad de 12 hs (7:00 AM-7:00 PM) y una temperatura controlada que se mantiene entre 19 y 23 °C. Los ratones reciben una dieta comercial de mantenimiento, salvo las madres en período de lactancia que reciben una dieta más rica en proteínas y grasas.

Para obtener embriones aptos para la microinyección se aparean hembras C57B1/6 con machos CBA/J y se obtienen híbridos de primera generación (F1) B6CBF1. Los machos F1 se mantienen en jaulas individuales y se los utiliza como padrillos para fecundar hembras F1 superovuladas. La superovulación se induce en hembras B6CBF1 jóvenes (entre 4 y 5 semanas de edad) mediante un tratamiento hormonal que comienza tres días antes de la recolección de óvulos fecundados con una inyección de 5 UI i.p. de PMS (*pregnant mare serum*) a las 2 PM. Dos días más tarde los animales reciben 5 UI i.p. de hCG (*human corionic gonadotrophin*) a la 1 PM. Inmediatamente estas hembras se colocan en jaulas individuales con machos B6CBF1. A la mañana siguiente, las hembras que fueron copuladas por el macho (se verifica mediante la presencia de un tapón vaginal de semen) son sacrificadas por dislocación cervical y mediante una incisión abdominal se exponen los tractos reproductivos. Los oviductos son aislados y se colocan en una placa de 35 mm con medio Whittens precalentado en un incubador a 37 °C y 5 % CO₂. Mediante el uso de una lupa de disección, un par de forceps y un par de agujas de 25 G, se disocian los oviductos para liberar los ovocitos fertilizados rodeados por una masa de células del cumulus. Estos son aspirados con una pipeta Pasteur previamente estirada sobre una llama y se colocan en una gota de medio Whittens con 1% de hialuroninasa por 5 min para separar los embriones de las células del cumulus. Posteriormente los ovocitos se pasan a través de 4 o 5 gotas de medio Whittens y se guardan en incubador en grupos de 20 hasta el momento de la microinyección. La cantidad obtenida de ovocitos fertilizados aptos para ser microinyectados es de aproximadamente 20 por hembra superovulada.

Microinyección pronuclear

Para la microinyección pronuclear se utilizan micropipetas sujetadoras e inyectoras preparadas a partir de capilares de borosilicato y estiradas con un estirador vertical de micropipetas. Los ovocitos se colocan en una gota de medio Whithens equilibrado con Hepes ubicada en el centro de una depresión semiesférica convexa de un portaobjetos, se observan bajo un microscopio y se seleccionan aquellos que tengan ambos pronúcleos bien visibles. Con la ayuda de la pipeta sujetadora y un micromanipulador se introduce la pipeta microinyectora en los embriones y se descarga 1–2 pl de la solución de ADN (aproximadamente 500 moléculas del transgén/pl) dentro del pronúcleo más visible

(figura 3). Los embriones microinyectados son colocados en el incubador hasta el momento de la transferencia. Se calcula que entre el 50 y el 70 % de los embriones sobrevive a la microinyección.

Transferencia embrionaria a hembras pseudopreñadas

Para obtener hembras pseudopreñadas se ponen en contacto la noche anterior a la recolección de embriones varias hembras jóvenes (de 6 y 9 semanas) con machos vasectomizados. A la mañana siguiente se seleccionan las hembras con tapón vaginal, signo de copulación.

Las hembras pseudopreñadas son anestesiadas con avertina 300 mg/kg, i.p.. Luego de una incisión lateral de aproximadamente 1 cm y con la ayuda de una lupa, se expone el oviducto a transferir. Se rompe la membrana que recubre el oviducto, se identifica la ampulla y se inserta a través de ella una pipeta pasteur fina cargada con los embriones. Se descargan en total unos 10 a 15 embriones por oviducto. Luego de la transferencia se cierra la incisión con sutura.

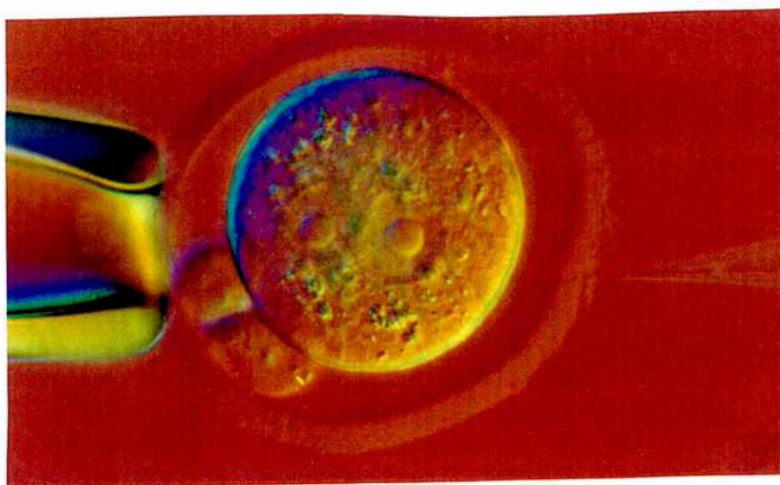


Figura 3: Microinyección pronuclear de ovocitos fertilizados

Fotografía de un embrión de ratón con ambos pronúcleos bien visibles en el instante previo a la microinyección pronuclear. A la izquierda se observa la pipeta sujetadora que sostiene el embrión por presión negativa. A la derecha la pipeta microinyectora cargada con una solución de ADN a punto de penetrar la zona pelúcida. Esta fotografía fue tomada en nuestro microscopio del INGEBI durante una sesión de microinyección.

Identificación de ratones transgénicos. Análisis de la presencia del transgén

Extracción de ADN

Los ratones nacidos de embriones inyectados se apartan de sus madres adoptivas a los 18–20 días y se separan por sexo. Luego de anestesiados con avertina 300 mg/kg *i.p.*, se corta la porción terminal de la cola (0,5–1 cm) con un bisturí y se la cauteriza. Los ratones son marcados en las orejas para su posterior identificación. Los segmentos de cola se incuban a 55 °C en buffer de digestión (50 mM Tris–HCl, pH 8; 100 mM EDTA; 0.5% SDS; 0,5 mg/ml proteinasa K) durante 12–14 hs. El ADN se extrae por métodos comunes (Low, 1992). Brevemente, el producto de la digestión se centrifuga para eliminar los pelos, se hace una extracción con 1 vol de PIC seguida de 1 vol de IC, y se precipita con 0,7 vol de 2–propanol. El ADN se resuspende en TE y se cuantifica espectrofotométricamente. La presencia del transgén se detecta por hibridización del ADN genómico con una sonda radiactiva, que reconoce selectivamente al ADN foráneo (*dot blot hybridization* y *southern blot hybridization* o utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos de secuencias transgénicas.

Southern Blot

Para realizar los *Southern blots*, se digieren 10 µg de ADN genómico con 50 UE de la enzima de restricción deseada por 12–14 hs. Luego se realiza una digestión adicional por 2 hs, agregando 20 UE de la misma enzima. Las digestiones se precipitan con 2,5 vol de etanol, se resuspenden en agua y luego se siembran en geles de agarosa 0,7 % a 3–5 V/cm. Al finalizar la corrida, los geles se desnaturalizan por 40 min (0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl), con agitación suave. Posteriormente, se sumergen en una solución neutralizante (0,5 M Tris–HCl pH 8; 1,5 M NaCl; 1 mM EDTA), 2 veces por 30 min y se transfieren por capilaridad (Sambrook *et al.*, 1988) a membranas de nylon no cargadas. Luego de la transferencia, el ADN se fija a las membranas con luz UV (120 mJ/cm²) y posteriormente se hibrida como se especifica abajo.

Dot blot

Para realizar *dot blots*, se desnaturalizan 10 µg de ADN genómico obtenido de la cola de cada ratón a 100 °C y luego, las muestras se siembran sobre una membrana de nylon en

forma manual o mediante una cuba de tipo *mini fold* conectada a una trampa de vacío. Una vez sembradas todas las muestras, la membrana se pasa en forma sucesiva sobre papeles Whatman 3MM embebidos en solución desnaturalizante (5 min) y luego en solución neutralizante (2 x 5 min). El ADN se fija con luz UV (120 mJ/cm²) y se hibrida como se detalla a continuación.

Hibridación de ADN

Todas las sondas radiactivas para hibridar *Southern blots*, *Northern blots* y *Dot blots*, se preparan a partir de fragmentos de ADN mayores de 200 pb, aislados de los plásmidos que los contienen, por digestión con enzimas de restricción seguida de electroelución, tal cual se especifica anteriormente, o por PCR seguido de electroelución.

Las sondas radiactivas se marcan por el método de iniciación al azar (*random priming*), utilizando un kit comercial de Gibco BRL (Rad-Prime) como se detalla a continuación. Se hierve 25 ng del fragmento a marcar en un tubo *eppendorf* durante 5 min, y luego se coloca rápidamente en hielo. El fragmento se incuba en una mezcla de marcación (preparada con reactivos

e instrucciones provistas por el proveedor), que contiene hexanucleótidos, dNTPs (excepto dCTP) y la enzima Klenow, conjuntamente con 5 µl de α[³²P]dCTP 10 µCi/µl (DuPont-NEN, Boston, MA), durante 30 min a 37 °C. La reacción se detiene con 5 µl buffer stop (provisto por el proveedor) y se guarda en hielo hasta ser utilizada.

Las prehibridaciones e hibridaciones se realizan en botellas rotatorias dentro de un horno de temperatura controlada. Las membranas se prehibridan entre 1 y 2 hs en una solución conteniendo 25 mM buffer fosfato, pH 7,2; 6X SSC; 1 mM EDTA; 5X Denhardt (0,1% ficoll, 0,1 % polivinilpirrolidina, 0,1 % seroalbúmina bovina); 0,5 % SDS y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón. Las hibridaciones se llevan a cabo en la misma solución de prehibridación durante 16 hs con el agregado de la sonda, previamente hervida por 5–10 min y enfriada otros 2 min en hielo. Los lavados de la membrana se realizan de la siguiente manera: 2 lavados iniciales de 15 min cada uno con 2X SSC, 0,1% SDS, a temperatura ambiente, y un lavado final de alta rigurosidad con 0,1X SSC, 0,1% SDS, a 65 °C). Una vez finalizados los lavados, las membranas se exponen en películas autorradiográficas, junto con pantallas intensificadoras de señal, a -70 °C. El tiempo de

exposición de las películas autorradiográficas varía según la marca radiactiva detectada en los filtros luego de los lavados.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La detección de animales transgénicos para el caso del transgén de fusión 3,8bβcas-hGH se lleva a cabo mediante la amplificación de una región interna del transgén de 412 pb (figura 9), utilizando los primers #149 (5'CCTGTGTATTTCTGGTGTG-3') y #150 (5'-AGTGGTTCGGGGAGTTGG 3'), y para la identificación de animales portadores de transgenes de POMC se utilizan los primers M329 (5'-GAAGTACGTCATGGGTCACT-3') y M330 (5'-AGCTCCCTCTTGAACCTCTAG-3'), que amplifican una banda de 180 pb para el alelo endógeno de POMC y una banda de 210 pb para el alelo transgénico de POMC (figura 21).

Las condiciones de reacción son: 100 ng de ADN genómico en buffer PCR (50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 0,25 mg/ml BSA; 1mM tartrazina y 2 mM MgCl₂); 0,2 mM dNTPs; 2,5 mM de cada primer y 1 U de Taq polimerasa de Gibco BRL en un vol. final de 10 µl. Las muestras se amplifican en un termociclador de capilares Idaho 1605 (Idaho Technologies, Idaho, USA) como se detalla a continuación: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 0 seg, *annealing* a 65 °C por 10 seg y elongación a 72 °C por 15 seg, y una elongación final a 72 °C por 10 min. Los productos de elongación se corren en un gel de agarosa 2% con bromuro de etidio (0,1 µg de bromuro de etidio/µl de agarosa) y se visualizan a la luz UV.

Estudio de la expresión espacial y temporal de los transgenes

Extracción de ARN

Para extraer tejidos destinados a la extracción de ARN total, se sacrifican por dislocación cervical, ratones del sexo y estadio fisiológico deseado. Los tejidos se extraen rápidamente con elementos de cirugía y se guardan a -70 °C hasta el momento de su procesamiento. La extracción de ARN total se realiza por el método del fenol ácido (Chomczynsky y Sacchi, 1987), como se describe a continuación. Los tejidos, excepto

hipófisis e hipotálamos, se homogenizan con un polytron en solución D (4 M de tiocianato de guanidina; 25 mM citrato de sodio; 0,5% lauril sarcosina y 0,1 M 2-mercaptoetanol) y, en forma sucesiva, se agrega: 0,1 vol de una solución 2 M de acetato de sodio, pH 4, 1 vol de fenol saturado con agua y 0,2 vol de una mezcla cloroformo-isoamílico 49:1. Luego, se mezcla con vortex vigorosamente durante 10 seg y se deja en hielo por 15 min. Las muestras se centrifugan a 10000 rpm en rotor Sorvall SS34 o a 14000 rpm en microcentrífuga, de acuerdo al volumen de la muestra, por 20 min a 4 °C; posteriormente, la fase acuosa se transfiere a otro tubo, con cuidado de no arrastrar la interfase donde se encuentran el ADN y proteínas, y el ARN se precipita con 2 vol de isopropanol. Los tubos se dejan a -70 °C durante 2 hs, y luego se centrifugan a 10000 rpm en rotor Sorvall SS34 o a 14000 rpm en microcentrífuga, de acuerdo al volumen de la muestra, por 20 min a 4 °C. El pellet se resuspende en solución D, 30% del volumen original utilizado, se transfiere a tubos *epENDORF*, en caso de haber empezado con volúmenes grandes, y se reprecipita con 1 vol de isopropanol. Las muestras se dejan otras 2 hs a -70 °C y se vuelven a centrifugar a 14000 rpm en microcentrífuga por 10 min a 4 °C. El pellet se lava con EtOH 75% y se resuspende en H₂O libre de RNAsas. El ARN se cuantifica por espectrofotometría (A260).

La homogenización de hipotálamos e hipófisis se realiza pasando el tejido, inmerso en 200 µl de solución D, varias veces por una jeringa de 1 ml, utilizando sucesivamente, agujas de 25 G y 30 G. El resto de la extracción se realiza por el método de fenol ácido, como se explica anteriormente.

Northern blots

10 a 20 µg de ARN total de los distintos tejidos o la totalidad del ARN obtenido de hipófisis e hipotálamos, se precipitan con 0,1 vol de 3 M acetato de sodio, pH 5,2, y 2,5 vol de EtOH. Las muestras se dejan a -70 °C durante 20 min y luego son centrifugadas a 14000 rpm en microcentrífuga refrigerada. Los pellets son lavados con EtOH 75% y resuspendidos en 10 µl de una solución al 80% de formamida con 50 µg/ml de bromuro de etidio.

Antes de correr las muestras en geles de agarosa, para lograr una desnaturalización total del ARN, éstas se calientan a 65 °C durante 15 min y se dejan en hielo hasta el momento

de la siembra. La electroforesis del ARN es realizada en geles de agarosa 1,2%, formaldehído 16% y buffer MOPS 1X, corriendo a un máximo de 5 V/cm en el mismo buffer MOPS.

Una vez terminada la electroforesis, el gel es fotografiado con una regla lateral para poder calcular, posteriormente, el peso molecular de las bandas detectadas por la hibridación con sondas radiactivas. Luego, se procede a realizar la transferencia del ARN a una membrana de nylon por capilaridad (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando como medio acuoso 20X SSC. El fijado del ARN a la membrana, marcación de sondas, prehibridación, hibridación y exposición de los *Northern blots* se efectúan como se especificó anteriormente para ADN, en la sección *Southern blots*.

Hibridización in situ de ARNm

Para hacer las hibridaciones *in situ* de glándula mamaria, los animales se sacrifican por dislocación cervical el día 11 del período de lactancia e inmediatamente se procede a extraer la glándula mamaria. Las glándulas se fijan durante una noche en 4% paraformaldehído (Sigma, St. Louis, MO) a 4 °C y luego se deshidratan pasándolas en forma sucesiva por etanol 70%, 95% y 100 %, aproximadamente 1 hora en cada paso. Finalmente, se colocan 1 hora en xileno y luego se embeben en parafina. Se hacen cortes seriados de glándula parafinada de 6 µm de espesor y se montan sobre portaobjetos cubiertos con polilisina. Los cortes se guardan a temperatura ambiente hasta ser usados. Previo a la hibridación, los cortes se deparafinizan, se rehidratan pasando en forma sucesiva por etanol 100%, 95% y 70% (10 min en cada paso) y luego se fijan 30 min en 10% formalina (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ).

Para la hibridación *in situ* de ARNm endógeno de POMC, se extraen por separado, hipófisis y cerebros de animales adultos, o cabezas enteras de animales postnatales. Los tejidos se congelan inmediatamente en recipientes plásticos conteniendo medio de congelamiento TBS (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC) y se mantienen a -70 °C hasta el momento de su utilización. Los tejidos y embriones se cortan en forma seriada utilizando un crióstato a -20 °C. Las secciones se montan en portaobjetos previamente tratados con vectabond (Laboratorios Vector, Ca, USA) y se fijan en 10% formalina por 30 min a temperatura ambiente.

Luego de fijar las muestras, ya sean de glándulas mamarias, hipófisis, cerebro o cabezas de animales postnatales, se realizan 3 lavados de 10 min en PBS (140 mM NaCl, 3 mM CaCl₂, 10 mM Na₂HPO₄ y 1,8 mM KH₂PO₄) y 2 lavados de 10 min cada uno en 2X SSC. Los portaobjetos se dejan drenar por 5–10 min y luego se prehibridan (50 % formamida, 4X SSC, 1X Denhardt, 250 µg/ml de ARN de transferencia, 10 mM DTT, 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón y 10% de sulfato de dextrano) cubiertos con cubreobjetos por 1 hora a 37 °C. Luego se incuban durante toda la noche a 37 °C con 11000–20000 cpm/µl de la sonda oligonucleotídica correspondiente marcada con α[³⁵S]dATP. Finalmente se realizan los siguientes lavados: 1X SSC, 1mM DTT (4 X 15 min a temperatura ambiente); 2X SSC, 50 % formamida (4 X 15 min a 37 °C); 1X SSC (3X 20 min a temperatura ambiente). A continuación, los portaobjetos se deshidratan a través de sucesivos pasajes por soluciones conteniendo concentraciones crecientes de etanol (70, 95 y 100%; 5 min en cada pasaje), se secan a temperatura ambiente por 30 min y se exponen a una placa autorradiográfica entre 7 y 10 días. Luego de revelarse el film radiográfico, los portaobjetos se sumergen en emulsión radiográfica (Kodak NTB3). Los portaobjetos se exponen entre 14 y 19 días y son luego revelados y contrateñidos con rojo neutro.

Las muestras de glándula mamaria se hibridaron con oligos antisentido específicamente diseñados para detectar el transcripto transgénico de hGH (5'-TGTTGCGAAGACACTCCTGAGGAACTGCA-3', hibrida con el exón 4 de hGH) o el ARNm de β-caseína murino (5'-CAGGAGAAATGACAGGCCCAAGAGATGGCA-3', hibrida con el exón 7 de β-caseína).

Para detectar el ARNm endógeno de POMC se utilizó un oligonucleótido de 26 pb antisentido de secuencias pertenecientes al exón 3 (E3-POMC: 5'-CGGAAGTGCTCCATGGAGAGCGCTTG-3'; ver figura 2).

Las sondas oligonucleotídicas se generan por marcación con la enzima nucleotidil transferasa terminal (rTdT, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) como se detalla a continuación. En un tubo *ependorf* se incuban 5 pmol del oligonucleótido sintético, 1X Buffer TdT, 50 pmoles [³⁵S]dATP (1300 Ci/mmol; Dupont-NEN, Boston, MA), 50 U de rTdT. Se incuban durante 15 min a 37 °C. Luego se agrega 1 µl de tRNA (10 mg/ml) y 150 µl de H₂O. Se extrae 2 veces con 1 vol de PIC seguido de una extracción con 1 vol de IC

y se precipita agregando 16 μ l de 5 M NaCl y 540 μ l (2,5 vol) de ETOH 100%. Se deja 30 min a -70 °C y se centrifuga a 14000 rpm durante 15 min. Los pellets se lavan con ETOH 70%, se secan y se resuspenden en 50 μ l de TE más 50 μ l de DTT 100 mM. Se toma 1 μ l del material resuspendido y se mide en contador de centelleo.

Análisis cuali y cuantitativo de la proteína transgénica

Obtención de muestras de leche

En el día 11 del período de lactancia, las madres son separadas de sus crías y anestesiadas con avertina 300 mg/kg *i.p.*. Luego de una inyección con oxitocina (syntocinon), 0,6 IU *i.p.*, se comienza a colectar las muestras de leche en tubos capilares mediante masajes suaves de las glándulas. Las muestras destinadas a la determinación de actividad biológica son guardadas sin ningún tipo de procesamiento a -70 °C hasta su utilización. Las muestras de leche que se analizan en geles de poliacrilamida y que se utilizan en los radioinmunoensayos son diluidas en Buffer Milk (25 mM Tris-HCl, pH 7,4; 125 mM NaCl; 5 mM KCl y 2 mM PMSF), desgrasadas con dos centrifugaciones a 2000 rpm por 10 min y guardadas a -70 °C hasta su utilización.

Para obtener lactosuero (fracción de la leche libre de caseínas), las muestras crudas de leche se diluyen 10 veces en un buffer que contiene 10 mM Tris-HCl, pH 8 y 10 mM CaCl_2 y son centrifugadas a 20.000 rpm durante 40 min. En el sobrenadante quedan las proteínas de suero, mientras que el pellet con todas las caseínas se descarta.

Detección de la proteína transgénica en geles de poliacrilamida

Las muestras de leche y lactosueros se fraccionan en un gel de SDS-PAGE 15% de poliacrilamida (Laemmli, 1970) luego de la determinación de su concentración proteica por el método de Bradford (Bradford, 1976). Una vez separadas, las proteínas se tiñen con *Coomasie blue* o se realiza un *Western blot* como se detalla a continuación. Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa por el método de transferencia semi-seca (Bjerrum y Schafer-Nielsen, 1986), que es luego bloqueada durante 12-14 hs a 4 °C en TBS 1X (Tris-HCl, pH 8; 0,9 % NaCl), 5% leche en polvo desgrasada. Como primer anticuerpo se utiliza un antisuero de conejo específico contra hGH diluido 1:1000 en la misma solución de bloqueo por 2 hs. Como segundo anticuerpo se usa un anti

conejo conjugado a peroxidasa diluído 1:2500 en solución de bloqueo durante 1 hora. El revelado del *Western blot* se realiza con un kit de quimioluminiscencia con reactivos *Renaissance* (DuPont–NEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de hGH en leche y en suero por Radioinmunoensayo (RIA)

Las concentraciones de hGH en leche se determinan por duplicados usando un radioinmunoensayo (RIA) específico contra hGH (Diagnostic Products Corporation) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para medir las muestras de leche provenientes de hembras transgénicas y no transgénicas se realizan diluciones seriadas de la muestras de leche procesadas (dilución 1/5; ver "*Obtención de muestras de leche*") de hasta 1/100000. Para cuantificar hGH en suero se extrae sangre por punción cardíaca de tres grupos de ratones diferentes (machos, hembras vírgenes y hembras lactantes) entre las 9 y 12 semanas de edad. La sangre se deja coagular a temperatura ambiente y luego el suero se extrae por centrifugación (10 min a 14000 rpm). Los sueros se guardan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día del ensayo. Las concentraciones de hGH en suero se determinan por duplicados usando un RIA específico contra hGH (Diagnostic Products Corporation) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Este RIA cuantifica hGH en concentraciones que van desde 1,6 a 30 ng/ml.

Determinación de la actividad biológica in vitro de hGH recombinante (Ensayo realizado en colaboración con la empresa BIOSIDUS)

Previo al ensayo la viabilidad de las células NB₂ se evalúa al microscopio teniendo en cuenta su morfología semi ovalada, refringentes y con membranas lisas. El día anterior al ensayo las células se ayunan con 1% Suero Fetal Bovino en estufa gaseada (5 % CO₂) a 37 °C por 24 hs. El día del ensayo, las células se lavan tres veces por centrifugación en medio Fisher suplementado con 10% Suero de Caballo (20 ml/lavado) y finalmente se resuspenden en 20 ml del mismo medio. Una alícuota de las células es utilizada para determinar su concentración mediante una cámara de Neubauer y posteriormente las células se diluyen en el mismo medio Fisher con 10% Suero de Caballo a 50.000 células/ml. Los estándares (Somatropin, estándar internacional de la OMS para hGH recombinante humana) y las muestras de leche cruda, se diluyen también en medio Fisher, 10% Suero de Caballo (los estándares de hGH se diluyen entre 1 10 ng/ml). En

una placa de ELISA de 96 pocillos se siembran por triplicado 100 μ l las distintas diluciones de las muestras de leche y hGH estándar. También se siembran por triplicado 100 μ l de medio Fisher con 10 % de Suero de Caballo (blanco negativo) y 100 μ l de medio Fisher con 10 % de Suero de Caballo y 10 % de Suero Fetal Bovino (control positivo de máximo crecimiento), en ambos casos sin muestras o estándar. A cada pocillo se le agrega 100 μ l de la resuspensión de células y se incuba la placa envuelta en papel aluminio durante 72 hs a 37 °C en estufa gaseada. Al término del período de incubación, se agrega a cada pocillo 10 μ l de una solución de 5 mg/ml de MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) en PBS y se incuban 4 hs a 37 °C en cámara húmeda. Al término de la incubación, las placas se centrifugan a 3000 rpm, se elimina el sobrenadante por volcado, se resuspenden los cristales precipitados en 200 μ l de etanol 96% y se lee la placa en espectrofotómetro de placa a 570 nm. La cuantificación de la actividad biológica se realiza correlacionando los valores obtenidos de las muestras de leche con la curva dosis respuesta obtenida con el estándar de hGH. Esto permite estimar un valor de Actividad Biológica comparativa en masa o unidades (μ g/ml o UI/ml).

Visualización de la proteína EGFP en animales transgénicos

Los animales adultos utilizados para extraer tejidos se anestesian con avertina 300 mg/kg *i.p.* y luego se perfunden con 10 ml de solución fisiológica, seguido de 50 ml de 4% paraformaldehído en PBS. Posteriormente, se extraen los tejidos deseados y se guardan a 4 °C *overnight* en 4% paraformaldehído en PBS, 10% sacarosa. Al día siguiente se incluyen en medio de congelamiento TBS y se guardan a -70 °C hasta el momento de ser procesados. En el caso de animales postnatales, se extrae la cabeza y se congela a -70°C en medio TBS.

Los tejidos, ya sean hipófisis, cerebros o cabezas postnatales se cortan en criostato y se montan en portaobjetos cubiertos con vectabond. Posteriormente se fijan en formalina 4% y, se cubren con un cubreobjetos y se visualizan en microscopio de fulorescencia

Localización del péptido β -endorfina y AgT por inmunohistoquímica

La detección del péptido β -endorfina y el AgT de SV40 se realiza por inmunohistoquímica, utilizando antisueros anti- β -endorfina o anti-AgT. Los animales utilizados para obtener los tejidos se perfunden con 4% paraformaldehído (excepto las cabezas postnatales) como se describe en la sección "*Visualización de la proteína EGFP en animales transgénicos*". Las muestras extraídas se guardan overnight a 4 °C con 4 % paraformaldehído en PBS, en el caso que sean destinadas a cortes con parafina, o con 4% paraformaldehído en PBS y 10% sacarosa, cuando destinadas a congelamiento y cortes en criostato. La inclusión en parafina se realiza como se describe en la sección "*Hibridización in situ de ARNm*", mientras que los tejidos destinados a ser cortados en criostato se guardan a -70 °C.

Los tejidos parafinizados o congelados se cortan y se montan en portaobjetos, y se procesan como se menciona en la sección "*Hibridización in situ de ARNm*". Luego de fijados, los cortes se someten a los siguientes lavados: 2 de 45 min en PBS, 1 de 30 min en KPBS (0,9% NaCl, 16 mM K_2HPO_4 y 3,6 mM KH_2PO_4). Posteriormente se incuban en 1% H_2O_2 en KPBS por 20 min, se vuelven a lavar en KPBS (3 veces por 5 min) y se preincuban por 2 hs en 0,3% Tritón X-100, 2% suero normal de cabra en KPBS. Luego se incuban durante toda la noche a 4 °C con la dilución apropiada del antisuero anti- β -endorfina o anti-AgT (1/1000 en 0,3 % Tritón X-100, 2 % suero normal de cabra en KPBS). El antisuero se lava en KPBS (2 x 20 min) y los complejos antígeno-anticuerpo se incuban con una solución de inmunoglobulinas biotiladas anti-conejo hechas en cabras (1/200 en 0,3 % Tritón X-100 en KPBS) por 2 hs a temperatura ambiente, y luego de un lavado de 20 min en KPBS se incuban por 1 hora con avidina-peroxidasa (1/1000 en 0,3 % Tritón X-100, 0,1 % BSA en KPBS). Finalmente se lavan en TBS y se incuban en una solución conteniendo 25 mg/ml de diaminobencidina en TBS, 0,05 % H_2O_2 . La reacción es detenida sumergiendo los portaobjetos en TBS y luego de ser deshidratados en alcohol con concentraciones crecientes (70, 95 y 100 %), son cubiertos con cubreobjetos utilizando permount como adhesivo.

RESULTADOS

Puesta a punto de las distintas etapas necesarias para producir ratones transgénicos mediante microinyección pronuclear de fragmentos de ADN

Durante la primera parte de mi Tesis de Doctorado se pusieron a punto las diferentes etapas necesarias para producir ratones transgénicos. Dichas etapas son: la obtención de cigotas, microinyección pronuclear y transferencia de embriones a hembras pseudopreñadas.

Recolección de cigotas

Con respecto a la obtención de cigotas, hemos decidido trabajar con crías híbridas entre las cepas C57BL/J y CBA/6JF1 (crías F1 B6CBF1) que, tal cual se especifica en la literatura (Hogan *et al.*, 1994), responden muy bien al tratamiento superovulatorio. Particularmente, en nuestro laboratorio hemos determinado que las hembras F1 B6CBF1 prepúberes, de 3 a 4 semanas de edad, son las que mejor responden. En promedio se generan se generan 20 embriones aptos para ser microinyectados por hembra. Por otro lado, la viabilidad de los embriones, medida *in vitro* como porcentaje de los embriones que llegan a blastocisto expandido, en general supera el 90%.

También hemos hecho una breve experiencia con la cepa NIH. En este caso, si bien la calidad del embrión es superior, ya que la transparencia de los mismos y el tamaño mayor de los pronúcleos facilita la tarea de microinyección, no se producen más de 15 embriones por hembra, y algo muy importante, la viabilidad *in vitro*, no supera el 60%.

Microinyección pronuclear de ovocitos fertilizados

Quizás, la etapa limitante en la producción de animales transgénicos resulta la microinyección pronuclear. Con respecto a esta etapa hemos realizado un experimento para evaluar la expresión de transgenes inyectados y determinar otros datos como % de lisis.

Se inyectaron cigotas de ratón utilizando un gen de fusión entre el promotor del gen de metalotioneína de rata (rMT) y el gen de β -galactosidasa (β -gal) de *E. coli*. Las cigotas microinyectadas se incubaron en medio Whittens suplementado con 50 mM ZnSO₄ para inducir la expresión de β -galactosidasa. Al día siguiente, los embriones de dos células fueron fijados en paraformaldehído 4% y luego incubados en presencia del sustrato cromogénico incoloro X-gal. El producto tiene un color azul intenso indicativo de la actividad del transgén. Los embriones que expresan el transgén se tiñen de un fuerte color azul a un débil celeste, dependiendo del grado de expresión, mientras que los que no lo expresan mantienen su coloración blanco amarillenta idéntica al de las cigotas no inyectadas (figura 4). Los resultados de este ensayo piloto (tabla 5) indicaron que el 80% de los embriones microinyectados se tiñeron en tonalidades que variaron desde celeste hasta azul intenso. Sólo el 15% de los embriones se lisaron por la microinyección, resultado por demás alentador, considerando que el promedio de lisis en distintos laboratorios alcanza un 30%. Estos valores nos indicaron que las microinyecciones en nuestro laboratorio eran exitosas, pero esto de ninguna manera nos aseguraba la producción de animales transgénicos, ya que para que esto sea posible era necesario garantizar otros aspectos tales como la integración del transgén en el genoma del embrión, la supervivencia de los embriones microinyectados y el mantenimiento de las pseudopreñeces a término.

Producción de ratones transgénicos

Para testear la capacidad de producir ratones transgénicos en nuestro laboratorio, se eligió la microinyección de un transgén con secuencias regulatorias del gen de la metalotioneína murina (mMT-I) y las secuencias codificantes del gen de la hormona de crecimiento humana (hGH) (figura 5). Este transgén se aisló de las secuencias plasmídicas cortando con la enzima de restricción *EcoRI*.

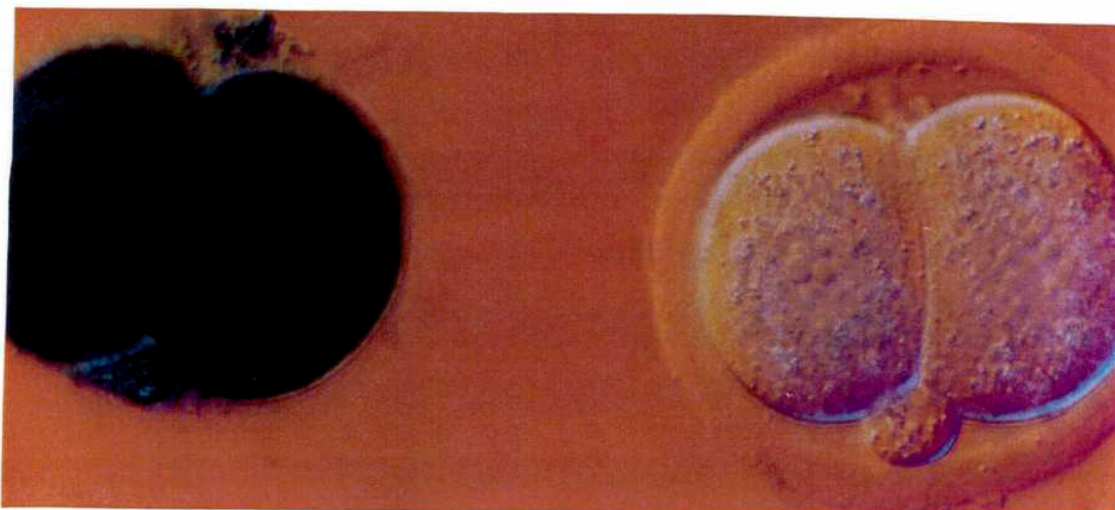


Figura 4: Microinyección de embriones de ratón con el transgén rMT/ β -gal
Embriones murinos de dos células microinyectado (izquierda) y no microinyectado (derecha) con el gen de fusión rMT/ β -gal. En presencia de metales pesados se induce la expresión del transgén y la β -galactosidasa producida es capaz de convertir el sustrato incoloro X-gal en un producto de color azul.

Tabla 5: Resultados obtenidos de la microinyección pronuclear de ovocitos fertilizados de ratón con el gen de fusión rMT/ β -gal

Embriones microinyectados con rMT/ β -gal	Lisados	Embriones de dos células a E1.5	Embriones azules
20	3	15 (75%)	12 (80%)

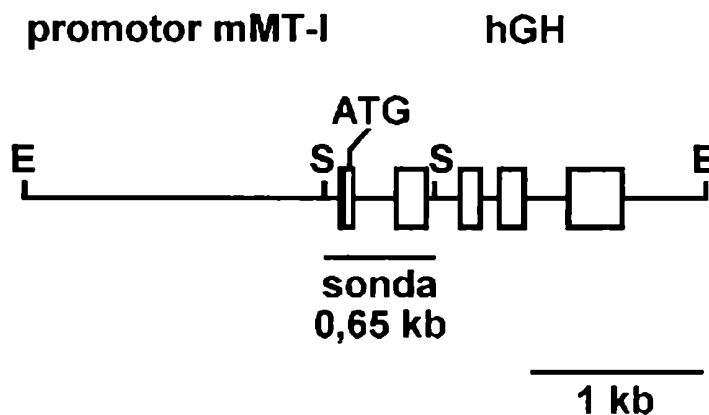


Figura 5: Transgén mMT-I/hGH

Transgén mMT-I/hGH con las secuencias promotoras del gen de metalotioneína I de ratón y las secuencias codificantes del hGH. El transgén se aisló de las secuencias plasmídicas cortando con la enzima de restricción *EcoRI*. En la figura también se muestra la sonda *SacI* de 0,65 kb, utilizada para hacer el *screening* de animales transgénicos, que abarca la región de fusión del transgén. Abreviaturas: S, *SacI*; E, *EcoRI*; ATG, inicio de la traducción.

En total se produjeron 15 nacimientos de embriones microinyectados, 8 machos y 7 hembras. A las tres semanas se les extrajo ADN de la porción terminal de la cola y se realizó un *dot blot*, utilizando una sonda radiactiva de 0,65 kb correspondiente a un fragmento *SacI* del transgén (figura 5). La hembra #9 resultó ser transgénica (figura 6).

El promotor de la metalotioneína se induce en presencia de metales pesados en varios tejidos. Sin embargo, existe una determinada expresión basal hepática que sería capaz de mantener altos niveles de hGH en circulación. Esto determinaría una mayor tasa de crecimiento de la hembra transgénica #9 con respecto a sus hermanas no transgénicas. En la figura 7 se muestran gráficos de curvas de pesos separados por sexo entre el día 18 postparto (destete) y el día 45 (fin de la pubertad), período de mayor actividad de hGH. En el gráfico correspondiente a las hembras se observa un mayor crecimiento de la ratona transgénica #9 en relación a sus hermanas no transgénicas. En la figura 8 se muestra una

fotografía la hembra #9 con dos de sus hermanas. El aumento de peso de la hembra #9 con respecto a la mayor de sus hermanas fue del 30% a los 45 días.

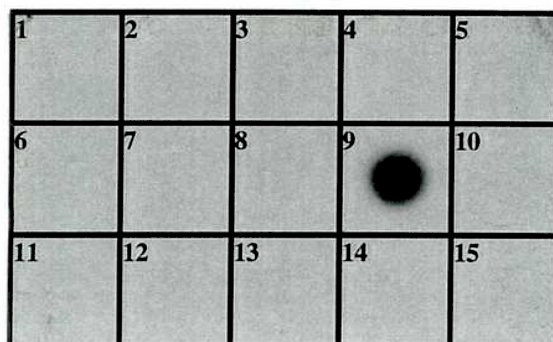


Figura 6: Detección de ratones transgénicos para mMT-I/hGH

Dot blot de muestras de ADN de ratones nacidos a partir de embriones microinyectados con mMT-I/hGH. Se sembraron 10 μ g de ADN genómico de cada ratón y se hibridaron con una sonda mMT-I/hGH *SacI* de 0,65 kb que abarca parte del promotor de mMT-I y parte de las secuencias codificantes de hGH (ver figura 5). De los 15 animales, la hembra #9 resultó transgénica.

Uno de los trastornos más comunes que se observan en ratones transgénicos que sobreexpresan hGH es la fertilidad reducida en hembras (Brem *et al.*, 1989). Pese a que estos animales ciclan en forma normal, generalmente tienen deficiencias durante el proceso de implantación de los embriones al útero, produciéndose abortos naturales. La hembra #9 resultó estéril, por lo tanto no fue posible expandir esta línea en nuestro laboratorio y no pudieron determinarse los niveles de hGH en circulación. De todas maneras, este experimento nos permitió corroborar que estábamos en condiciones de producir ratones transgénicos en nuestro laboratorio y así poder estudiar la regulación de la expresión tejido-específica de nuestros genes de interés.

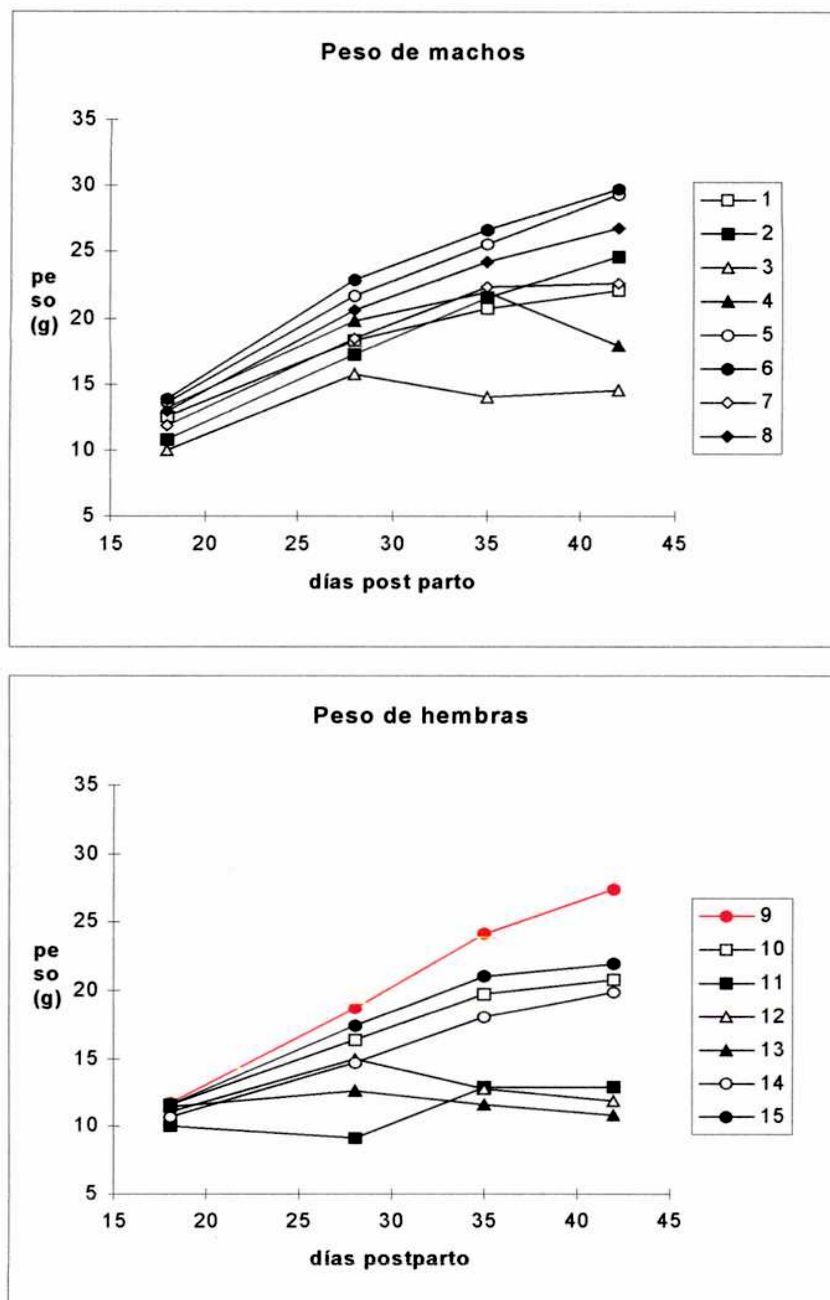


Figura 7: Crecimiento diferencial de la hembra transgénica mMT-I/hGH

Seguimiento de pesos de los ratones nacidos a partir de embriones microinyectados con el transgén mMT-I/hGH entre los días 18 y 43 postparto, período del desarrollo con mayor actividad de la hormona de crecimiento (pubertad). El único animal transgénico detectado por *dot blot*, la hembra #9 (ver figura 6), tuvo un mayor crecimiento durante dicho período con respecto a sus hermanas no transgénicas.



Figura 8: Hembra transgénica mMT/hGH

Fotografía de la hembra transgénica mMT/hGH #9 a los 45 días postparto (derecha) junto a dos de sus hermanas no transgénicas (centro e izquierda).

Identificación de las secuencias flanqueantes del gen de β -caseína capaces de dirigir selectivamente la expresión de genes heterólogos a las células epiteliales de la glándula mamaria

Construcción de transgenes capaces de dirigir la expresión de proteínas heterólogas a la glándula mamaria de ratones.

Para estudiar si las secuencias 5'flanqueantes del gen bovino de β -caseína eran capaces de dirigir la expresión de proteínas de interés farmacéutico a la glándula mamaria de ratones transgénicos y cumplir con los requisitos fundamentales para el aprovechamiento de la glándula mamaria como biorreactor (altos niveles de expresión, expresión espacial y temporal correcta y alta penetrancia), se generó un transgén de fusión utilizando y 3,8 kb de las secuencias 5'flanqueantes del gen de β -caseína bovino, fusionadas a las secuencias codificantes completas de un gen de interés terapéutico, el gen de hGH (figura 9).

El transgén, llamado 3,8b β cas-hGH, se liberó de las secuencias plasmídicas con las enzimas *NotI* y *SalI* y se generaron animales transgénicos por microinyección pronuclear.

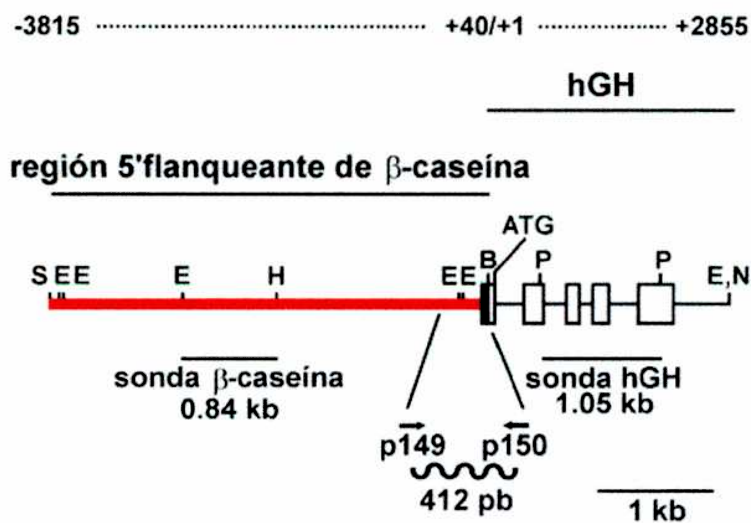


Figura 9: Estructura del transgén 3,8b β cas-hGH

Símbolos: línea gruesa roja, 3,8 kb de la región 5'flanqueante del gen bovino de β -caseína; línea negra fina, secuencias intrónicas y 3'flanqueantes del gen hGH; rectángulo negro, exón 1 del gen bovino de β -caseína; rectángulos blancos, exones del gen hGH. p149 y p150, primers sentido y antisentido utilizados para el screening de animales transgénicos por PCR. El inicio de la traducción se marca con ATG. Abreviaturas: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; N, *Not*I; P, *Pvu*II; S, *Sal*I. Los fragmentos de 0,84 kb *Eco*RI/*Hind*III de la región 5'flanqueante del gen de β -caseína y *Pvu*II de 1kb del gen hGH se usaron como sondas para detectar animales transgénicos.

Producción de animales transgénicos con el transgén 3,8b β cas-hGH

El transgén 3,8b β cas-hGH se microinyectó en el pronúcleo de ovocitos fertilizados. Estos se transfirieron al oviducto de hembras pseudopreñadas y a las tres semanas del nacimiento se detectó la presencia de animales transgénicos por *dot blot* o PCR.

En total nacieron 58 animales de embriones microinyectados; dos hembras (#3 y #50) y un macho (#45) resultaron transgénicos. La presencia del transgén en la hembra #3 fue

detectada por *dot blot* (figura 10) hibridado con un fragmento *PvuII* de 1,05 kb del gen hGH (figura 9). En los ratones #45 y #50, la presencia del transgén se detectó por PCR (figura 11), al amplificarse una banda de 412 pb que abarca parte del promotor de β -caseína y el primer exón de hGH (figura 9). Estos resultados se confirmaron por medio de un *Southern blot* de ADN genómico obtenido de biopsias de cola de estos animales (figura 12). El ADN se digirió con *EcoRI*, luego se transfirió a membranas de nylon y fue hibridado con una sonda de 0,84 kb *EcoRI/HindIII*, correspondiente al promotor de β -caseína, o un fragmento *PvuII* de 1,05 kb, correspondiente al gen hGH. Una banda de 2,5 kb, con la sonda de 0,84 kb (figura 12A), y otra de 2,3 kb, con la sonda de 1,05 kb (figura 12B), ambas diagnósticas del transgén, se detectaron en las mismas muestras que habían resultado positivas por *dot blot* y por PCR. En la muestra correspondiente al F0 #3 del *Southern blot* hibridado con la sonda interna de hGH, también se observan dos bandas no esperadas, una de 1,3 kb y otra de alto peso molecular (figura 12B), sugiriendo la ocurrencia de un evento intrarecombinatorio. No obstante, no se visualizaron bandas extras para la misma muestra, en la membrana hibridada con la sonda interna de β -caseína (figura 12A).

Por densitometría de *Southern blots* de ADN de colas provenientes de crías transgénicas de los animales fundadores, siempre utilizando la sonda interna de β -caseína, se determinó que las líneas #3 y #45 poseen entre 2 y 3 copias del transgén insertadas en tándem, mientras que la línea # 50 posee entre 6 y 10 copias (tabla 6).

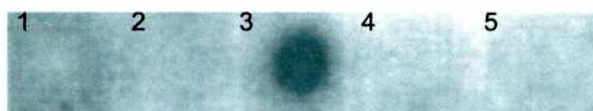


Figura 10: Detección de ratones transgénicos 3,8 β cas-hGH

Dot blot de una camada de ratones (F0 #1 hasta F0 #5), nacidos a partir de embriones microinyectados con el transgén 3,8 β cas-hGH, hibridado con una sonda de *PvuII/PvuII* de 1 kb del gen de hGH (ver figura 9). La hembra #3 resultó el único animal transgénico de esta camada.

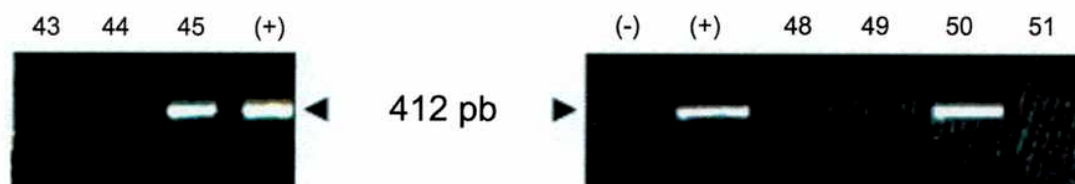


Figura 11: Detección de ratones transgénicos 3,8b β cas-hGH

PCR de muestras de ADN de dos camadas de ratones nacidos a partir de embriones microinyectados con el transgén 3,8b β cas-hGH. El macho F0 #45 y la hembra F0 #50 resultaron transgénicos. Los primers utilizados fueron el #149 (sentido), que aparea sobre el promotor de β -caseína, y el #150 (antisentido), que aparea sobre el exón 1 de hGH (ver figura 9). También se incluyó una muestra de ADN con el transgén exógeno como control positivo (+).

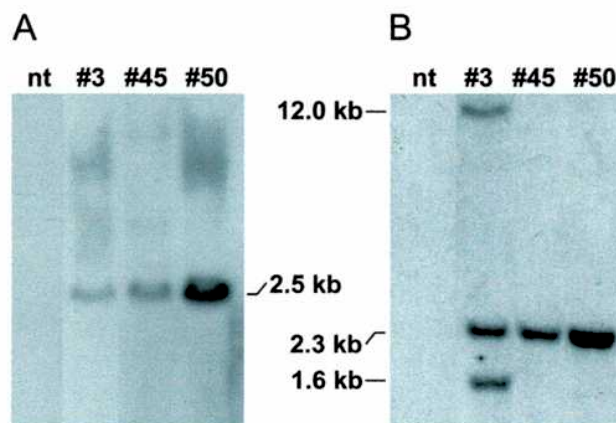


Figura 12: Análisis de animales transgénicos por *Southern blot*

Southern blot de muestras de ADN digeridas con *EcoRI* de los ratones F0 #3, transgénico por *dot blot* y F0 #45 y #50, transgénicos por PCR. Para hibridar se utilizaron las sondas radiactivas mostradas en la figura 6: un fragmento del promotor bovino de β -caseína *EcoRI/HindIII* de 0,85 kb (A) y un fragmento del gen hGH *PvuII/PvuII* de 1,05 kb (B).

Heredabilidad del transgén

Para generar colonias de animales transgénicos y estudiar la heredabilidad del transgén se aparearon los animales transgénicos obtenidos por microinyección (F0) con ratones no transgénicos y se analizó ADN de las crías por PCR para detectar la presencia del transgén. En la tabla 6 se resumen los datos de heredabilidad del mismo. En todos los casos el transgén se heredó a la filiación 1 (F1), indicando que este se integró en los embriones en un estadio que aseguró la presencia del transgén en las células germinales. En las líneas #45 y #50 parecería que el evento de integración fue producido previamente a la primera división mitótica de la cigota microinyectada, debido a que el porcentaje de transgénicos F1 es cercano al 50%. Mientras tanto, en la línea #3 el porcentaje de transgénesis de los animales F1 resultó del 38%. Por lo tanto, si bien no se realizó ningún análisis estadístico, existe la posibilidad que el F0 generado sea un mosaico. En la tabla 6 también se observa que el transgén se heredó en forma exitosa a todas las generaciones analizadas obtenidas a partir de la cruce de ratones heterocigotas para el transgén con ratones no transgénicos.

Tabla 6: Datos de heredabilidad de los transgenes en las distintas líneas de transgénicos.

	Línea #3	Línea #45	Línea #50
	transg./n tot. (%)	transg./n tot. (%)	transg./n tot. (%)
F1	8/21 (38)	7/14 (50)	6/12 (50)
F2	51/87 (59)	13/21 (62)	3/5 (60)
F3	14/30 (47)	4/8 (50)	
F4	4/6 (67)		

F: filiación; transg.: ratones transgénicos diagnosticado por PCR; n tot.: número total de ratones analizados.

Detección de hGH en leche

Se obtuvieron muestras de leche de hembras transgénicas y no transgénicas en el día 11 del período de lactancia y se sometieron a un radioinmunoensayo utilizando un

anticuerpo específico contra hGH. Los niveles de expresión de hGH encontrados en leche, que se detallan en la tabla 7, indican que en la línea #3 estos valores oscilaron entre 0,2 y 0,5 mg/ml para muestras de leche obtenidas de hembras pertenecientes a diferentes generaciones. Estos valores equivalen a un 2-5% de los niveles de β -caseína que se encuentran en leche bovina. Los niveles de expresión de hGH en la línea #50 resultaron cercanos a los 2 mg/ml, aproximadamente un 20% de los niveles de β -caseína en leche bovina. Mientras tanto, los niveles de expresión de hGH en muestras de la línea #45 resultaron muy bajos, entre 105 y 121 ng/ml, o sea 0,001% de los niveles de β -caseína bovina.

Estos resultados indican que la expresión del transgén depende en forma considerable del sitio de integración, ya que las cantidades de hGH detectadas en leche no se correlacionan con la cantidad relativa de copias en tándem insertadas en las distintas líneas.

Tabla 7: Determinación de hGH en leche por RIA

Línea	Número de copias del transgén ^a	Niveles de hGH en leche (mg/ml)
#3 (+/-)	2	0,382 ± 0,027 (10)
#3 (+/+)	2 x 2	0,764 ± 0,228 (4)
#50 (+/-)	6	2,22 (2) ^b
#45 (+/-)	2	1,13 x 10 ⁻⁴ (2) ^c
nt	--	ND (2)

Los resultados son promedios de valores obtenidos para un número de muestras de leche indicado entre paréntesis. Cada muestra de leche corresponde a un ratón distinto. El error estándar fue calculado sólo cuando más de 3 muestras fueron analizadas.

^a: El número de copias del transgén se determinó por *Southern blot* y posterior densitometría.

^b: Los valores individuales fueron de 1,80 y 2,63 mg/ml.

^c: Los valores individuales fueron de 1,04 x 10⁻⁴ y 1,21 x 10⁻⁴ mg/ml.

nt: no transgénico

(+/-): heterocigota para el transgén.

(+/+): homocigota para el transgén.

ND: <1.4 x 10⁻⁶ mg/ml

Para detectar la presencia de hGH recombinante en la leche de las distintas líneas de animales transgénicos, también se separaron muestras de proteínas totales de leche y lactosuero (leche descaseinada) en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y posteriormente, se tiñeron con el colorante *Coomassie blue* (figuras 13A y B). En los animales transgénicos que expresan hGH es de esperarse la aparición de una banda de 22 kD. En la figura 13A, se observaron bandas de aproximadamente 22 kD en las muestras de proteínas totales de leche de una hembra no transgénica y una hembra transgénica de la línea #3. Estas no se encuentran en los lactosueros de las mismas. Sin embargo, en la muestra de proteínas lácteas totales de una hembra transgénica de la línea #50 se detectaron 2 bandas muy próximas en la misma zona, mientras que en el lactosuero de la misma sólo apareció la banda más baja de las dos. Si la carga de proteínas sembradas aumenta en forma considerable (figura 13B) también es posible visualizar una única banda de 22 kD en el lactosuero de las muestras de la línea #3. Por lo tanto, la hGH recombinante con un tamaño correcto de 22 kD comigra con una proteína láctea que no se encuentra presente cuando la leche es descaseinada. Un extracto proteico de proteínas hipofisarias de ratón se usó como patrón de hormona de crecimiento. La banda mayoritaria correspondiente a hormona de crecimiento de ratón que tiene el mismo tamaño que su par humana comigró con la hGH recombinante (figuras 13A y B).

La presencia de hGH recombinante en muestras de proteínas totales de leche obtenidas el día 11 de la lactancia fue también detectada por *Western blot* (figura 13C). Como primer anticuerpo se usó un antisuero de conejo específico contra hGH. Como segundo anticuerpo se usó un anticonejo acoplado a peroxidasa. En la figura 13C se observa que mientras en la leche de animales no transgénicos no se detecta ninguna banda, en las muestras de leche de animales transgénicos de las líneas #3 y #50 aparece una banda de 22 kD correspondiente a hGH recombinante. Adicionalmente, por *Western blot* se detectó una banda extra de 44 kD en la muestra de la línea #3.

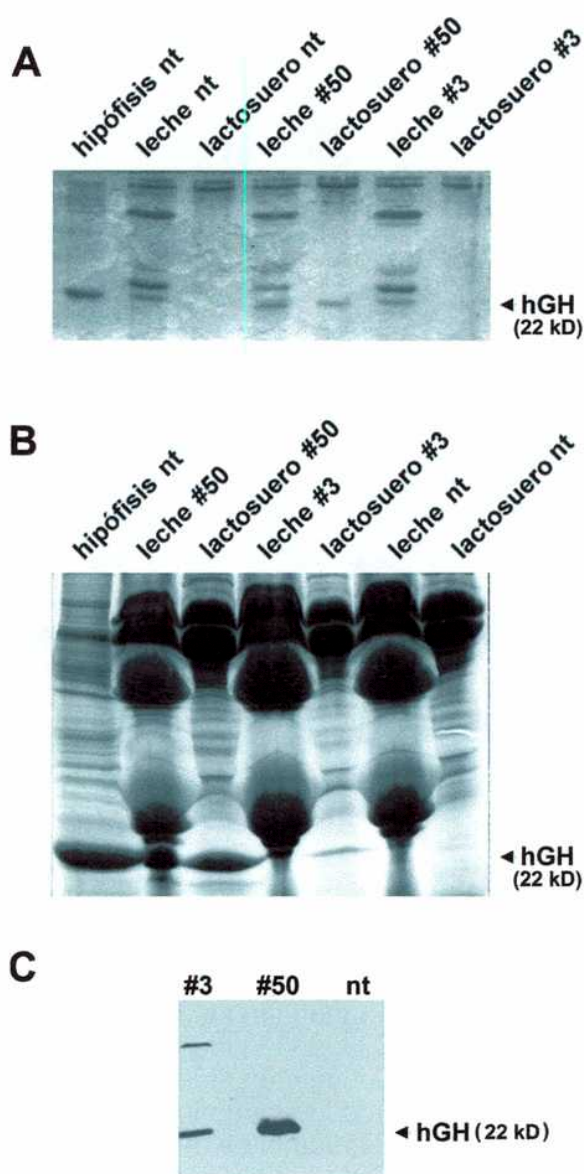


Figura 13: Caracterización de hGH en leche de ratones transgénicos

Muestras desgrasadas de leche (0,3 μ l en A y C y 2 μ l en C) y lactosero (0,5 μ l en A y 2 μ l en B) de ratonas transgénicas de las líneas #3 y #50 y no transgénica (nt) fueron sometidas a electroforesis en 15% SDS-PAGE, bajo condiciones reductoras. Adicionalmente un extracto proteico de hipófisis de un ratón no transgénico fue incluido (50 y 150 μ g de proteínas en A y B, respectivamente). Los geles fueron teñidos con el colorante *Coomasie Brilliant Blue* (A y B) o transferidos a un filtro de nitrocelulosa para un *Western blot* (C) con un antisuero específico contra hGH.

Expresión espacial del transgén

Para estudiar la expresión tejido específica del transgén se analizó la presencia de ARNm de hGH en glándula mamaria de ratones transgénicos de las líneas #3 y #50.

Se extrajo ARN total de glándula mamaria lactante (día 11) y se realizó un *Northern Blot*, utilizando para hibridar, una sonda correspondiente al exón 5 de hGH. Como se observa en la figura 14, se detectaron altos niveles de una banda de aproximadamente 1 kb, correspondiente a mensajero maduro de hGH, solamente en las muestras transgénicas analizadas; mientras que el mensajero de β -caseína de ratón se detectó en todas las muestras estudiadas, transgénicas y no transgénicas.

En la muestra correspondiente a la línea #3 también se observa una banda extra de aproximadamente 1,44 kb, que probablemente corresponda a un producto transcripcional que se originó como consecuencia del evento recombinatorio ocurrido en esta línea, tal cual se demuestra en el *Southern Blot* (figura 12B). Este mensajero relacionado con hGH probablemente explique el origen del producto proteico inmunoreactivo de alto peso molecular visualizado en el *Western Blot*.

La expresión tejido específica fue estudiada con detalle en las líneas #50 (figura 15A) y #3 (figura 15B). Se analizaron muestras totales de ARN de varios tejidos de hembras lactantes (día 11) de la línea #50 y #3 por medio de un *Northern blot* hibridado con una sonda del exón 5 de hGH. En ninguna de las dos líneas se detectó expresión ectópica del transcripto de hGH. Sí fue detectada una fuerte señal de 1.00 kb, correspondiente a hGH, en las calles donde fueron separadas las muestras de glándula mamaria incluidas como control positivo.

Muestras de ARN de hipófisis (tejido donde normalmente se expresa la hormona de crecimiento) de hembras lactantes (día 11), transgénicas y no transgénicas, se incluyeron en los *Northern* correspondientes a las líneas #50 y #3. Una leve señal de aproximadamente 0.92 kb correspondiente al transcripto de la hormona de crecimiento murina (mGH) fue detectada en ambas. Contrariamente, en ninguna de las muestras de hipófisis transgénicas, se observó la señal del transcripto de hGH.

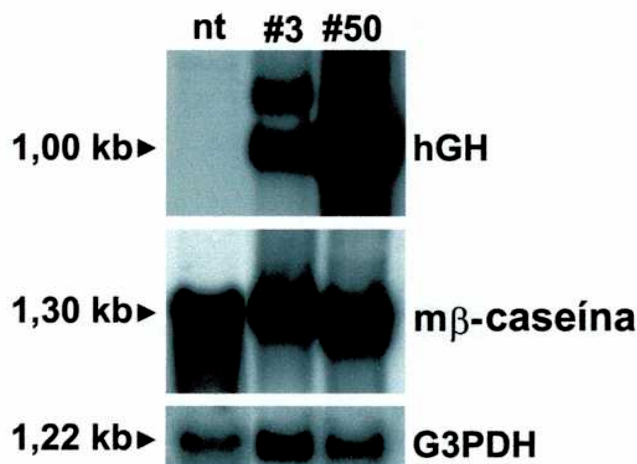


Figura 14: Expresión de hGH en glándula mamaria de ratones transgénicos

Análisis por *Northern blot* de muestras de ARN aisladas de hembras en el período medio de la lactancia (11 días postparto), transgénicas de las líneas #3 y #50 y no transgénica (nt). El ARN total fue separado por electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes y transferido a una membrana de Nylon, posteriormente hibridada en forma secuencial con sondas radioactivas del exón 5 del gen hGH, un fragmento de 200 pb del exón 7 de β -caseína murina (m β -caseína) aislado por PCR y un ADNc del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de ratón (G3PDH).

La determinación de hGH en suero constituye una alternativa para determinar expresión ectópica en aquellos tejidos cuyos productos de secreción son liberados al torrente circulatorio. La concentración de hGH se determinó en suero por radioinmunoensayo (RIA) en muestras de machos, hembras vírgenes y lactantes de las líneas #3 y #50, utilizando ratones de no más de 12 semanas (Tabla 8). Las muestras de suero obtenidas de ratones control no presentaron inmunoreactividad contra hGH. En la línea #50 se encontraron bajos niveles de hGH en las muestras de hembras preñadas, mientras que en

hembras vírgenes y lactantes no se detectó la presencia de hGH en la mayoría de los sueros. Contrariamente, en todas las muestras transgénicas de la línea #3 se encontraron niveles muy estables de hGH en suero, de aproximadamente 10 ng/ml, independientemente del sexo y estadio fisiológico. En las muestras de suero de animales no transgénicos no se detectó hGH. Estos resultados indican un cierto grado de expresión ectópica que puede ser el resultado de una expresión basal mínima en diferentes tejidos. No obstante, estos niveles de hGH en circulación no produjeron ninguno de los trastornos fisiológicos observados en ratones que sobreexpresan hGH en circulación, como fertilidad disminuida y mayor crecimiento (Brem *et al.*, 1989).

Tabla 8: Determinación de hGH por RIA en suero de animales transgénicos de las líneas #3 y #50.

Línea	Niveles de hGH en suero (ng/ml)			
	Hembras			Machos
	Vírgenes	Preñadas	Lactantes	
#3 (t)	10.33 ± 0.92 (13)	7.49 ± 0.99 (4)	10.18 ± 0.54 (9)	9.92 ± 0.99 (5)
#50 (t)	ND (6) ^a	4.49 (2) ^b	ND (1)	ND (7)
nt	ND (14)	NE	ND (4)	ND (6)

Los resultados son promedios ± errores estándar (sólo para n>3) de valores obtenidos para un número de muestras de suero indicado entre paréntesis de ratones transgénicos (t) de las líneas #3 y #50 y no transgénicos (nt).

ND: <1.6 ng/ml

NE: no evaluado

^a: La concentración de hGH en uno de los sueros medidos, no incluido en la tabla, fue de 8,51 ng/ml.

^b: Los valores individuales fueron: 3,89 y 5,08 ng/ml.

Expresión temporal del transgén

La expresión de los genes de caseína en glándula mamaria sigue un patrón estricto de desarrollo fuertemente dependiente de las acciones hormonales que ocurren durante la preñez y lactancia.

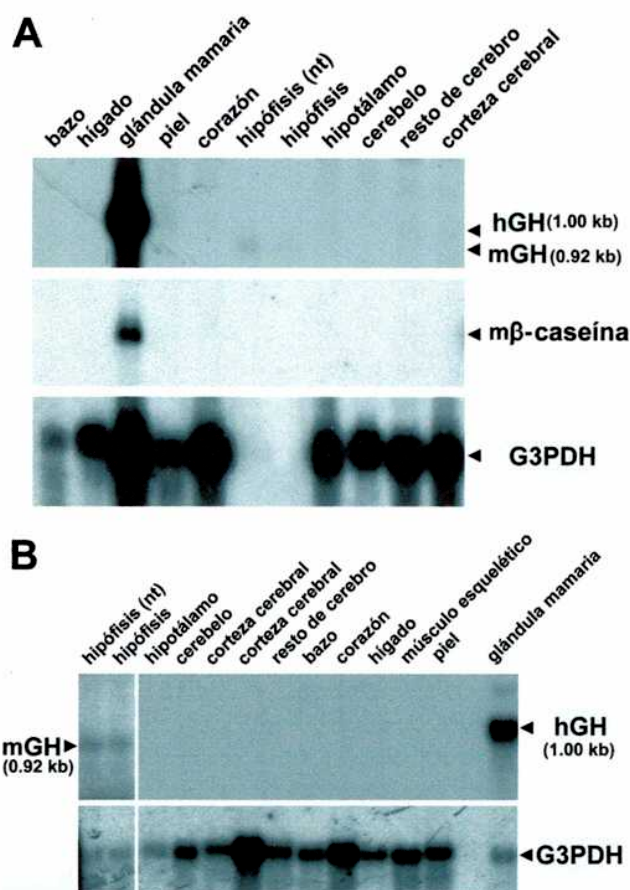


Figura 15: Expresión tejido específica de hGH en ratones transgénicos

Análisis por *Northern blot* de muestras de ARN obtenido de varios tejidos de hembras transgénicas de las líneas #50 (A) y #3 (B) en el período medio de la lactancia (11 días postparto). Adicionalmente, ARN de hipófisis de un animal no transgénico (nt) fue incluido en cada corrida. El ARN total fue separado por electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes y transferido a membranas de Nylon, posteriormente hibridadas en forma secuencial con sondas radiactivas del exón 5 del gen hGH (A y B), un fragmento de 200 pb del exón 7 de β -caseína murina (m β -caseína) aislado por PCR (A) y un ADN copia del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) de ratón (A y B). En B, el recuadro pequeño a la izquierda corresponde a la porción de la membrana que contiene las hipófisis no transgénicas y transgénicas hibridadas con la sonda de hGH luego de triplicar el tiempo de exposición observado a la derecha.

La expresión temporal del transgén se estudió durante el desarrollo de la glándula mamaria en hembras de la línea #3 (figura 16A) y #50 (figura 16B). Muestras de ARN total de glándula mamaria fueron tomadas durante varios estadios de la preñez y lactancia y sujetas a un análisis por *Northern Blot*. Una fuerte inducción de la expresión del transgén ocurre durante el parto. Los niveles de hGH se mantienen en el límite de detección hasta el día 17 de la preñez y aumentan más de 50 veces luego del parto (día 1 de la lactancia). Contrariamente, el transcripto de β -caseína de ratón empieza a detectarse a partir del día 10 de la preñez y se incrementa gradualmente hasta llegar a niveles máximos el día del parto. Este patrón de expresión del gen murino de β -caseína fue descrito anteriormente (Persuy *et al.*, 1992). En bovinos, el nivel de ARNm de β -caseína durante la gestación es bajo y se incrementa en forma abrupta al comenzar la lactogénesis. (Goodman y Schanbajer, 1991). Por lo tanto, estos datos indican que el transgén sigue el patrón de desarrollo bovino pese a encontrarse en un entorno heterólogo.

Expresión celular específica del transgén

En trabajos previos se ha descrito en forma extensiva, a través de estudios histoquímicos, que el direccionamiento de la expresión de genes reporteros a un cierto tipo celular, en determinadas ocasiones resulta en un patrón de expresión heterogéneo o de mosaicismo celular (Faerman *et al.*, 1995; McGowan *et al.*, 1989). Para determinar con qué grado de homogeneidad las 3,8 kb del promotor bovino de β -caseína son capaces de dirigir la expresión de hGH a las células epiteliales de la glándula mamaria, se llevaron a cabo estudios de hibridización *in situ* en secciones de parafina de glándulas mamarias control y transgénicas. Las autorradiografías de las secciones hibridizadas con el oligo antisentido contra β -caseína murina muestran una expresión uniforme independientemente del genotipo o línea analizada (figura 17). Contrariamente, la señal de las secciones hibridadas con el oligo antisentido hGH muestran un patrón de expresión que depende del genotipo y línea analizada, aunque como se observa en los controles, este patrón resulta siempre homogéneo.

Para corroborar lo observado anteriormente, las secciones se sumergieron en una emulsión fotográfica y se expusieron durante dos semanas. Los cortes se observaron al microscopio y se contaron granos de plata sobre tejido. Los datos obtenidos confirman que la expresión del transgén sigue un patrón homogéneo en todas las líneas y que no hay mosaicismo celular. En la figura 18 se muestra que existe un alto grado de correlación entre número de granos de plata encontrados y el nivel de expresión de hGH en leche determinado por RIA.

Por lo tanto, la diferencia de expresión observada en las distintas líneas y genotipos se debe a una expresión variable dentro de cada célula y no a diferentes grados de penetrancia en el tejido.

Determinación de la actividad biológica de hGH recombinante

El bioensayo aplicado proporciona un método cuantitativo de la actividad biológica de hGH medida en función de su actividad proliferativa. Este se basa en el efecto de estimulación de la proliferación específica sobre la línea celular Nb₂, desarrollada a partir de un linfoma de rata y que contiene receptores a prolactina capaces de ser estimulados por hGH. El agregado de hormonas lactogénicas u hGH desencadena una respuesta proliferativa en esta línea celular. La concentración final celular, estimada por la capacidad de las mitocondrias de las células vivas de reducir sales de MTT a cristales de formazan (son de color azul y la coloración resultante se puede medir por espectrofotometría), luego de las 72 hs de incubación con la hormona es directamente proporcional a la concentración de la misma. Por lo tanto, es posible establecer una relación dosis–respuesta y de esa manera cuantificar actividad biológica de una muestra en relación a un estándar.

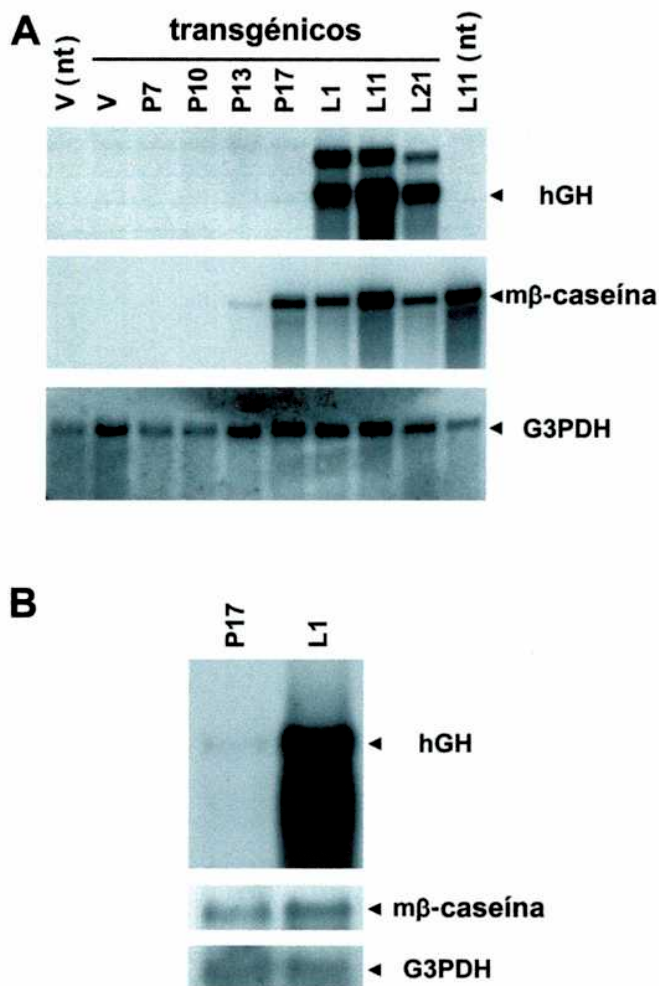


Figura 16: Expresión temporal del ARN transgénico

Northern blot de muestras de ARN total de glándula mamaria de hembras transgénicas de las líneas #3 (A) y #50 (B), vírgenes (V), preñadas (P) y lactantes (L) y de hembras no transgénicas (nt), virgen y lactante. El número entre paréntesis indica el día de preñez (postcoito) o lactancia (postparto). Ambas membranas fueron hibridadas en forma secuencial con sondas radiactivas del exón 5 del gen hGH, un fragmento de 200 pb del exón 7 de β -caseína murina (m β -caseína) aislado por PCR y un ADNc del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) de ratón.

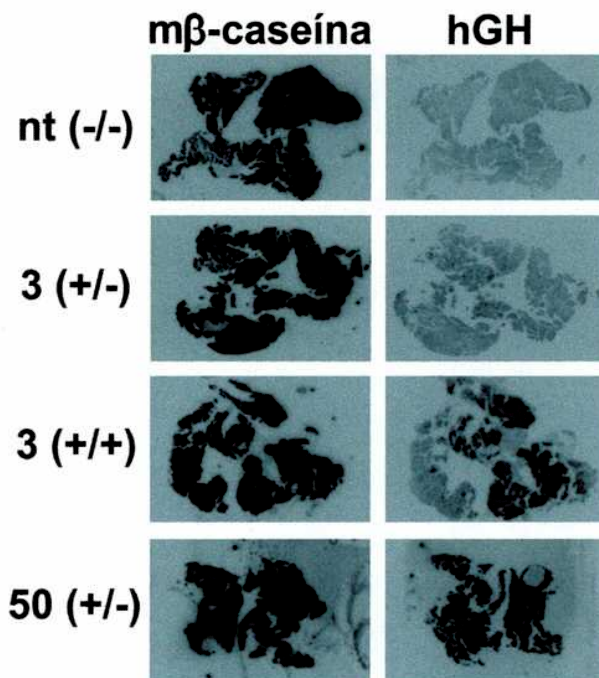


Figura 17: Hibridación *in situ* de β -caseína murina y el transgén 3,8b β -caseína-hGH en glándula mamaria de hembras lactantes

Las secciones de parafina de glándula mamaria tomadas a media lactancia (día 11) se hibridaron con oligodeoxinucleótidos antisentido contra el exón 7 de β -caseína murina (m β -caseína) o el exón 4 de hGH, ambos marcados con α [³⁵S]dATP. Las secciones se expusieron a placas autorradiográficas entre 7 y 10 días. nt (-/-), glándula no transgénica; 3 (+/-), glándula proveniente de un ratón de la línea #3 heterocigota para el transgén; 3 (+/+), glándula proveniente de un ratón de la línea #3 homocigota para el transgén; 50 (+/-), glándula proveniente de un ratón de la línea #50 heterocigota para el transgén.

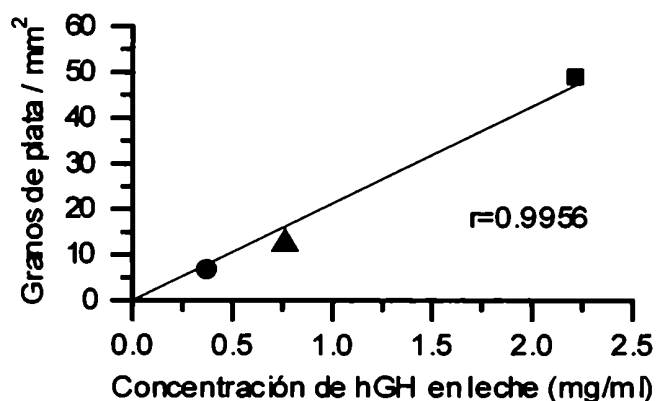


Figura 18: Curva de correlación entre niveles de ARNm de hGH transgénico encontrados en células epiteliales de glándula mamaria y niveles de hGH transgénica encontrados en leche. Los niveles de ARNm de hGH transgénico se estimaron por hibridización *in situ* y se cuantificaron por medición de cantidad de granos de plata por mm². Cada cuantificación corresponde a un promedio de 100 mediciones independientes al azar, obtenidas de cuatro secciones diferentes de una misma glándula. Los niveles de hGH en leche fueron determinados por RIA, como se muestra en la tabla 3. 3 (+/-), glándula proveniente de un ratón de la línea #3 heterocigota para el transgén; 3 (+/+), glándula proveniente de un ratón de la línea #3 homocigota para el transgén; 50 (+/-), glándula proveniente de un ratón de la línea #50 heterocigota para el transgén; nt (-/-), glándula proveniente de un ratón no transgénico.

La actividad biológica fue determinada en muestras de leche obtenidas el día 11 de lactancia de hembras transgénicas de las líneas #3 y #50 y de una hembra no transgénica. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9. No se detectó actividad biológica lactogénica en la muestra de leche de la hembra no transgénica. Sí se detectó actividad lactogénica proliferativa en las muestras de leche de las líneas #3 y #50: 1051 – 1060 mU/ml y 7900 mU/ml, respectivamente. Cabe destacar que estos valores equivalen a 0,350 mg/ml y 2,6 mg/ml de la hormona estándar utilizada en el ensayo, valores que son coincidentes con los determinados por RIA en las muestras de leche de hembras transgénicas. De estos datos se puede concluir que la actividad lactogénica de la hGH recombinante producida en la leche de ratonas de las líneas #3 y #50 es similar a la hGH estándar utilizada en el ensayo.

Tabla 9: Actividad biológica de la hGH recombinante. Actividad biológica *in vitro* de hGH recombinante en muestras de leche de ratonas transgénicas de las líneas #3 y #50.

Línea	Actividad Biológica (mU/ml)	Masa equivalente de hGH estándar (mg/ml)
F0 #3 (t)	1060	0,353
F3 #3 (t)	1051	0,350
#50 (t)	7900	2,633
nt	< 1	< 3,3 x 10 ⁻⁵
nt	< 1	< 3,3 x 10 ⁻⁵

Abreviaturas: F0 y F3, Generación 0 y Generación 3; t, transgénico; nt, no transgénico.

Identificación de secuencias en cis necesarias para la expresión neuronal del gen de POMC

Recientemente hemos demostrado en nuestro laboratorio que es posible direccionar transgenes a neuronas de POMC de ratones transgénicos, utilizando 13 kb de la región 5' flanqueante del gen de POMC de ratón (Young *et al.*, 1998). Los transgenes utilizados, $-13/+14\text{POMC}^*$ y $-13/+8\text{POMC}^*$ (figura 19), también dirigieron una correcta expresión transgénica en células hipofisarias de POMC (tabla 10). En cambio, cuando la longitud del promotor se redujo a 2 kb, utilizando la construcción $-2/+8\text{POMC}^*$ (figura 19), la expresión fue sólo adecuada en células endócrinas hipofisarias, sin observarse expresión transgénica en neuronas del SNC (tabla 10). Sabíamos, entonces, que la información necesaria para activar la transcripción de POMC en neuronas endorfinérgicas reside dentro de las 11 kb existentes entre -2 y -13 kb de la región 5' flanqueante. La intención de nuestro laboratorio, a largo plazo, consiste en aislar este elemento responsable de la expresión de POMC en neuronas (nPOMC).

Tabla 10: Análisis delecional realizado en ratones transgénicos que permitió ubicar nPOMC dentro de un fragmento de 11 kb de la región 5' flanqueante de POMC (entre -13 y -2 kb).

Transgén	# de líneas	Hipófisis	Hipotálamo
$-2/+8\text{POMC}^*$	6	6/6	0/3
$-13/+14\text{POMC}^*$	3	3/3	3/3
$-13/+8\text{POMC}^*$	3	3/3	3/3
$-2/+14\text{POMC}^*$	3	3/3	0/3

*El asterisco denota la presencia de un oligo heterólogo de 30 pb insertado en exón 3 de POMC.

En una primera etapa planeamos, mediante un análisis delecional en ratones transgénicos, llegar a aislar a nPOMC a una resolución de 4 kb. Para ello dividimos a las 11 kb a estudiar en 3 segmentos contiguos: distal (de -13 a -9 kb), medio (de -9 a -5 kb) y proximal (de -5 a -2 kb).

En los experimentos previos, la expresión transgénica era determinada por hibridización *in situ* usando sondas oligonucliotídicas, marcadas con $\alpha[^{35}\text{S}]\text{dATP}$, que reconocen una secuencia heteróloga de 30 pb insertada en el exón 3 de los transgenes de POMC (figura 2). Las secciones de cerebro eran sumergidas en una emulsión fotográfica y para resolver los transcritos a nivel celular se requerían tiempos de exposición de aproximadamente 20 – 30 días.

Para lograr disminuir los tiempos de trabajo, se insertó un casete con el gen de la proteína verde fluorescente de medusa en una versión humanizada (EGFP), que permite analizar la expresión del transgén en forma inmediata a los cortes con criostato por visualización en microscopio de fluorescencia

Construimos 3 transgenes nuevos para cubrir los segmentos distal (-13/+8POMC-EGFP) medio (-9/+8POMC-EGFP) y proximal (-5/+8POMC-EGFP) de la región 5' flanqueante del gen de POMC de ratón (Figura 19).

El casete de EGFP, que además contiene secuencias de poliadenilación del virus SV40, se insertó en un sitio *StuI* del exón 2 de POMC, previo al ATG que funciona como inicio de traducción.

Para determinar si las maquinarias de transcripción y traducción eran capaces de interpretar la información del gen de fusión y producir EGFP, previo a la generación de animales transgénicos, se hizo una transfección transiente en la línea celular corticotrópica de ratón AtT20, que expresa POMC. Considerando que las tres construcciones fueron realizadas por inserciones de secuencias 5'flanqueantes, de POMC de diferente tamaño, al plásmido p-2/+8POMC-EGFP (figura 19, ver materiales y métodos), que ya tenía el casete de EGFP insertado, la transfección se hizo solamente con el plásmido p-5/+8POMC-EGFP.

Como control de transfección se incluyó un plásmido conteniendo el gen de la β -galactosidasa bajo el control transcripcional del promotor de CMV. También, para determinar la especificidad de la expresión de EGFP, se hicieron transfecciones transientes con ambos plásmidos en la línea celular fibroblástica de ratón SNL/76.

Como era de esperarse, la expresión de EGFP sólo se produjo en células AtT20, mientras que en ambas líneas celulares se detectó β -galactosidasa (figura 20).

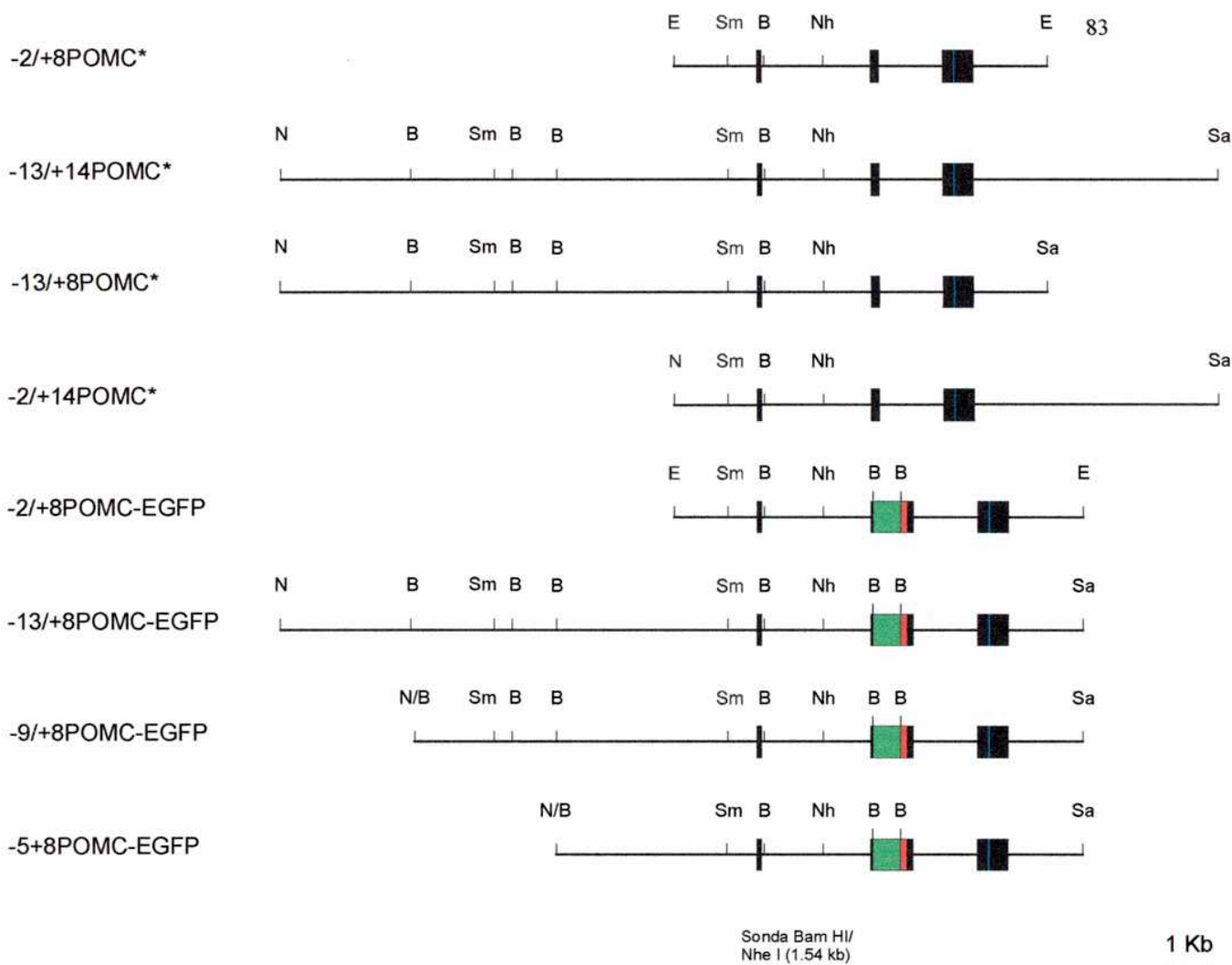


Figura 19: Transgenes utilizados para el análisis delecional destinado a encontrar el elemento regulatorio nPOMC

Los transgenes $-2/+8\text{POMC}^*$, $-13/+14\text{POMC}^*$, $-13/+8\text{POMC}^*$ y $-2/+14\text{POMC}^*$ fueron utilizados en análisis delecionales previos y permitieron ubicar al elemento nPOMC en entre -2 y -13 kb del inicio de transcripción del gen de POMC (Rubinstein *et al.*, 1993; Young *et al.*, 1998). El transgén $-2/+8\text{POMC-EGFP}$, una versión de $-2/+8\text{POMC}^*$ con un casete de EGFP insertado en el exón 2 previo al ATG que demarca el inicio de la transcripción, fue generado durante el presente trabajo y se utilizó para construir los transgenes, $-13/+8\text{POMC-EGFP}$, $-9/+8\text{POMC-EGFP}$ y $-5/+8\text{POMC-EGFP}$, destinados al análisis delecional para resolver el elemento nPOMC dentro de las porciones distal ($-13/-9$ kb), media ($-9/-5$ kb) y proximal ($-5/-2$ kb). Símbolos: rectángulos negros, exones de POMC; rectángulo verde, EGFP; rectángulo rojo, secuencias poly A de SV40; línea azul, oligonucleótido heterólogo de 30 pb insertado en el exón 3; líneas negras, intrones y regiones flanqueantes de POMC. Abreviaturas: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; N, *Not*I; Nh, *Nhe*I; Sa, *Sal*I; Sm, *Sma*I.

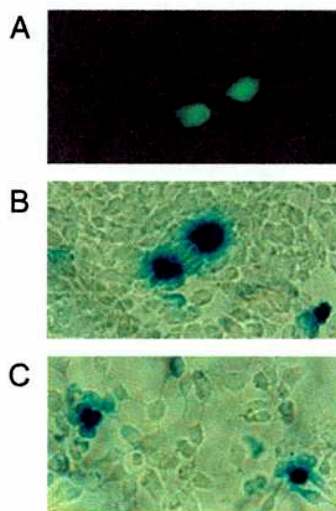


Figura 20: Tansfecciones transientes con la construcción -5/+8POMC-EGFP

A: Células Att-20 transfectadas con el plásmido -5/+8POMC-EGFP, visualizadas en microscopio de fluorescencia. B, células Att-20 transfectadas con la construcción CMV- β -gal. C, células SNL76 transfectadas con la construcción CMV- β -gal.

Una vez que se pudo constatar que las construcciones funcionaban correctamente, se procedió a generar animales transgénicos. Se realizó la microinyección pronuclear de embriones de una célula que fueron transferidos a hembras pseudopreñadas. Los ratones nacidos a partir de embriones microinyectados se diagnosticaron por PCR, para la presencia, luego del destete. Como los transgenes, al igual que los usados en trabajos previos, contienen insertado un oligo heterólogo de 30 pb en el exón 3, la estrategia utilizada se basó en la utilización de primers a ambos lados del oligo. De esta forma se amplifica una banda de 210 pb a partir de los transgenes insertados y 180 pb a partir del gen endógeno, que por otra parte sirve como control positivo de la reacción de PCR (figura 21).

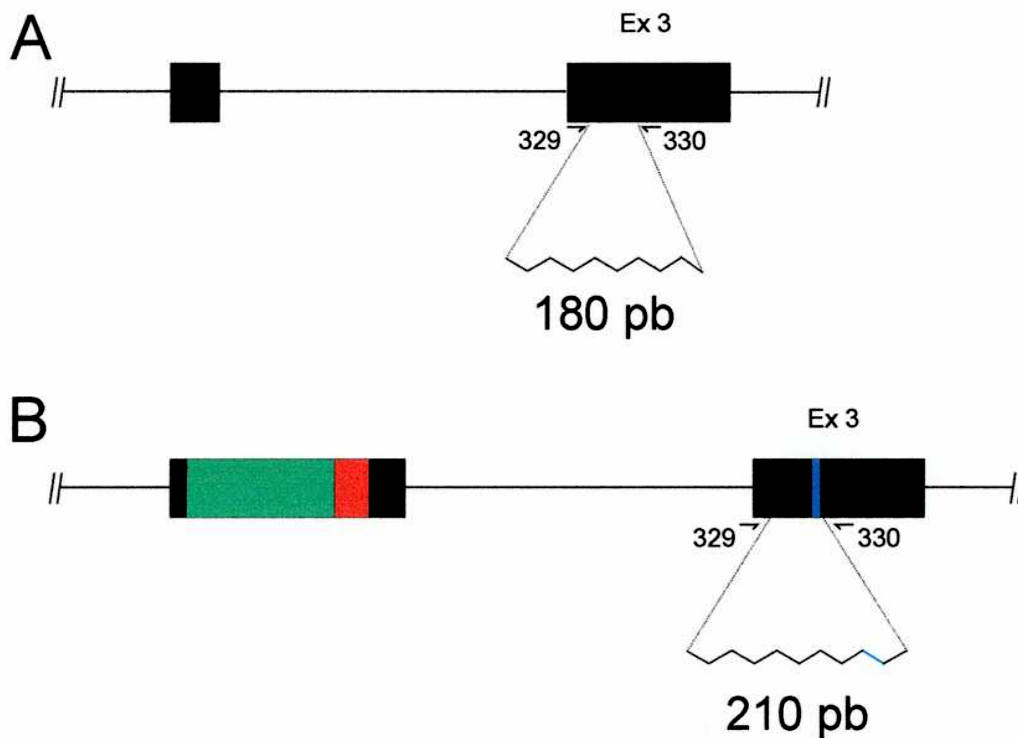


Figura 21: Estrategia por PCR utilizada para realizar el screening de animales transgénicos.

La inserción de un oligonucleótido heterólogo de 30 pb en el exón 3 del gen de POMC, en los transgenes, permite amplificar por PCR bandas de diferente tamaño a partir del gen endógeno (A) y de los transgenes (B), utilizando el mismo set de primers (ver materiales y métodos). Símbolos: rectángulos negros, exones de POMC; rectángulo verde, EGFP; rectángulo rojo, secuencias poly A de SV40; línea azul, oligonucleótido heterólogo de 30 pb insertado en el exón 3; líneas negras, intrones y regiones flanqueantes de POMC. Abreviatura: E3: exón 3 de POMC; 329, primer sentido; 330, primer antisentido.

En la tabla 11 se muestra el resultado de los screenings realizados por PCR. En total se detectaron 9 animales transgénicos, 4 para la construcción $-5/+8$ POMC-EGFP, 4 para $-9/+2$ POMC-EGFP y una para $-13/+8$ POMC-EGFP.

Una camada de 6 ratones nacidos a partir de embriones microinyectados con $-5/+8$ POMC-EGFP debió ser sacrificada luego del parto (animales en estadio P1), porque la madre se encontraba en mal estado. El análisis por PCR a partir de ADN extraído de cola diagnosticó dos animales transgénicos, los F0s #7 y #8 (figura 22). A estos animales

se les extrajeron las cabezas enteras y se guardaron a -70°C hasta el momento de procesadas. El evento de transgénesis en estos ratones no se confirmó posteriormente por *Southern blot* por falta de ADN. Otro de los animales transgénicos para la misma construcción, el macho F0 #13, fue diagnosticado con mucha dificultad. Apenas pudo visualizarse por PCR una banda diagnóstica del transgén (figura 23A). Este animal no pudo ser detectado por *Southern blot* (figura 23B), utilizando una sonda de 1,2 kb *BamHI/NheI* correspondiente al primer exón de POMC. Sin embargo, la transgénesis en este ratón se confirmó porque dejó descendencia transgénica (tabla 12). Es probable que el F0 #13 haya tenido bajo número de copias insertados en tándem, que sumado a un alto grado de mosaicismo, mantendría la concentración del transgén en el ADN extraído por debajo del umbral de detección por *Southern blot*. Otra explicación posible sería la inserción de un transgén con la zona homóloga a la sonda deletada por algún evento de recombinación, lo que determinaría, probablemente, que el transgén no se exprese correctamente.

El resto de los animales transgénicos, el F0 #18 para la construcción $-5/+8\text{POMC-EGFP}$, los F0s #1, #4, #7 y #8 para la construcción $-9/+8\text{POMC-EGFP}$ y F0 #5 para la construcción $-13/+8\text{POMC-EGFP}$ se detectaron por PCR y *Southern blot* (tabla 11).

Tabla 11: Screening de animales nacidos a partir de embriones microinyectados con transgenes de POMC/EGFP

Transgén	Nacimientos de embriones microinyectados	Animales transgénicos F0 detectados por PCR	Animales transgénicos F0 detectados por Southern blot
$-5/+8\text{POMC-EGFP}$	18	4	1 [§]
$-9/+8\text{POMC-EGFP}$	8	4	4
$-13/+8\text{POMC-EGFP}$		1	1

[§] Sólo fueron sometidos a análisis por Southern blot dos de los animales F0 detectados por PCR.

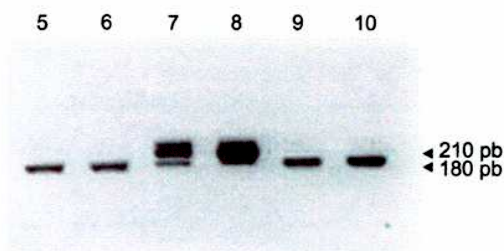


Figura 22: Detección por PCR de ratones postparto transgénicos $-5/+8$ POMC-EGFP

PCR de muestras de ADN de una camada de ratones postparto nacidos a partir de embriones microinyectados con el transgén $-5/+8$ POMC-EGFP. Los F0 #7 y #8 resultaron transgénicos. Los primers utilizados fueron el #329 (sentido) y el #330 (antisentido), que aparean sobre el exón 3 de POMC (ver figura 21).

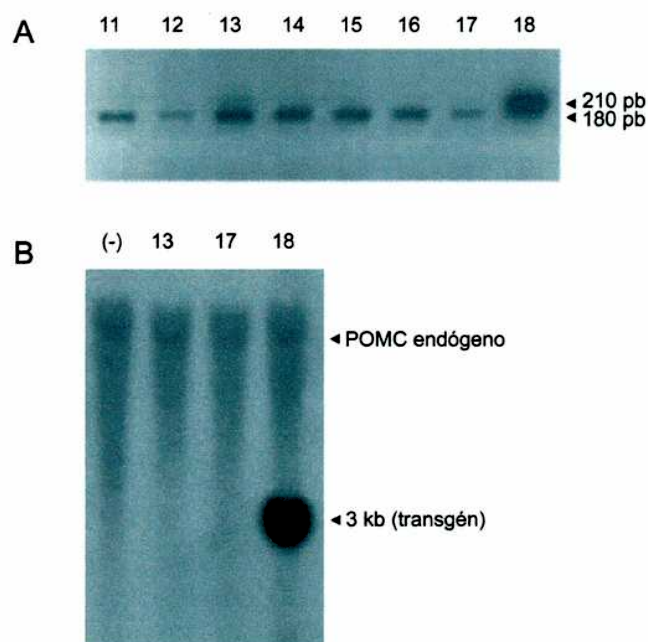


Figura 23: Análisis de ratones transgénicos para $-5/+8$ POMC-EGFP por PCR y Southern blot

(A): PCR de muestras de ADN de una camada de ratones nacidos a partir de embriones microinyectados con el transgén $-5/+8$ POMC-EGFP. El F0 #18 resultó transgénico, mientras que el F0 #13 se diagnosticó como dudoso. Los primers utilizados fueron el #329 (sentido) y el #330 (antisentido), que aparean sobre el exón 3 de POMC (ver figura 21). (B): Southern blot de muestras de ADN digeridas con *Bam*HI de los ratones F0 #13, dudoso según el diagnóstico por PCR, y F0 #18, transgénico por PCR. Para hibridar se utilizó una sonda radiactiva *Bam*HI/*Nhe*I de 1.54 kb, correspondiente al intrón 1 del gen de POMC (ver figura 19).

Heredabilidad de los transgenes

Todos los animales fundadores diagnosticados, excepto los animales #7 y #8 de la construcción -5/+8POMC-EGFP sacrificados en P1, fueron capaces de heredar el transgén a crías F1. Por lo tanto, en todos los casos el evento integratorio se produjo en un estadio que aseguró la presencia del transgén en la línea germinal. Mientras tanto, algunos de F0 resultaron mosaicos debido a que la frecuencia de transgénesis en las crías F1 resultó muy por debajo del 50% (Tabla 12).

Tabla 12: Heredabilidad de las distintas líneas transgénicas obtenidas con las distintas construcciones

Transgén	Animal fundador	Sexo	F1 transgénicas/ F1 totales (%)
-5/+8 POMC-EGFP	F0 #7	-	Sacrificado en P1
	F0 #8	-	Sacrificado en P1
	F0 #13	M	5/25 (20)
	F0 #18	M	4/9 (44)
-9/+8 POMC-EGFP	F0 #1	M	6/18 (33)
	F0 #4	M	9/13 (69)
	F0 #7	M	3/14 (21)
	F0 #8	H	2/7 (29)
-13/+8 POMC-EGFP	F0 #	M	ND

Abreviaturas: M: macho; H, hembra; F, filiación; P1, postparto 1; ND, no determinado.

Estudio de la expresión de EGFP en los ratones transgénicos

Para visualizar la expresión de EGFP, se extrajo la cabeza de animales P1 o el cerebro por y la hipófisis, en forma separada, de animales adultos previamente fijados in vivo con paraformaldehído. En todos los casos se hicieron cortes coronales de cerebros adultos a la altura de núcleo arcuato, de hipófisis adultas y de cabezas enteras de animales P1 a la altura de la hipófisis y núcleo arcuato. Los cortes se visualizaron inmediatamente en microscopio de fluorescencia para determinar o no presencia de EGFP.

En la tabla 13 se resumen los datos obtenidos de expresión de EFP en hipófisis e hipotálamo.

Tabla 13: Resumen de los resultados obtenidos de expresión de EGFP en las diferentes líneas de animales transgénicos generados para realizar en análisis delecional propuesto

Transgén	Expresión hipofisaria	Expresión hipotalámica
-5/+8POMC-EGFP	3/4	0/4
-9/+8POMC-EGFP	3/4	0/4
-13/+8POMC-EGFP	1/1	1/1

Los primeros animales estudiados correspondieron a la construcción -5/+8POMC-EGFP. Se realizaron cortes coronales de animales de las 4 líneas generadas y se observaron al microscopio de fluorescencia. En tres líneas, los animales F0 P1 #7 y #8 y en animales adultos F1 de la línea #18 se detectó expresión de EGFP en hipófisis (figura 24). Mientras tanto, en varios animales de la línea #13 no se visualizó expresión de EFP en hipófisis. Cuando se observaron cortes coronales de cerebro a nivel del núcleo arcuato de las cuatro líneas, no se detectó expresión alguna de EGFP. Adicionalmente, se realizó un experimento de hibridización *in situ* de secciones de cerebro e hipófisis de los 2 animales P1 y de un F1 de la línea #18, utilizando el oligo E2-POMC (ver figura 2), que detecta ARNm de POMC endógeno. Como era de esperarse, en las hipófisis se detectó una fuerte expresión de POMC en el lóbulo intermedio y en corticotropos. Cuando se analizaron secciones seriadas de estos mismos cortes al microscopio de fluorescencia, se observó una perfecta expresión de EGFP de acuerdo a los patrones transgénicos descritos anteriormente (Young *et al.* 1998). Contrariamente, cuando se observó la expresión de EGFP en secciones seriadas que contenían núcleo arcuato y expresión de POMC, la fluorescencia verde resultó negativa. En la figura 25 se muestra la hibridización *in situ* realizada para la línea #18.

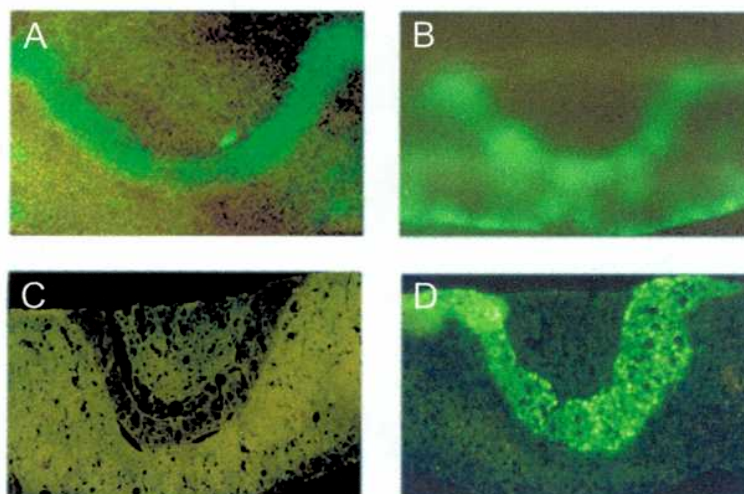


Figura 24: Detección de EGFP en hipófisis transgénicas para $-5/+8\text{POMC-EGFP}$

Cortes coronales de cabezas enteras, a la altura de la hipófisis, de los animales postnatales F0 #7 (A) y F0 #8 (B), y de hipófisis de animales adultos de la línea #13 (C) y de la línea #18 (D), todos visualizados en el microscopio de fluorescencia.

El análisis de las líneas correspondientes a la construcción $-9/+8\text{POMC-EGFP}$, resultó muy similar al observado para la construcción $-5/+8\text{POMC-EGFP}$. Las cuatro líneas generadas se visualizaron al microscopio de fluorescencia. En tres de ellas se detectó expresión de EGFP (figura 26). Como ocurrió en la anterior línea, no se detectó expresión de EGFP en núcleo arcuato de ninguna línea.

Estos resultados, a priori, nos indicaban que el elemento nPOMC estaría ubicado en la porción distal (entre -9 y -13 kb de la región $5'$), ya que en trabajos previos se había descrito la expresión del transgén $-13/+8\text{POMC}^*$ (ver figura 19) en núcleo arcuato de animales transgénicos (Young *et al.*, 1998). Sin embargo, la expresión de este transgén se detectó por hibridización *in situ* y no por fluorescencia. Por lo tanto, para descartar que los resultados obtenidos no se deben a la falta de expresión de EGFP en neuronas de POMC del núcleo arcuato, por alguna cuestión particular de esas células, se generó una línea de animales transgénicos con un transgén conteniendo EGFP y las mismas regiones flanqueantes que el transgén $-13/+8\text{POMC}^*$.

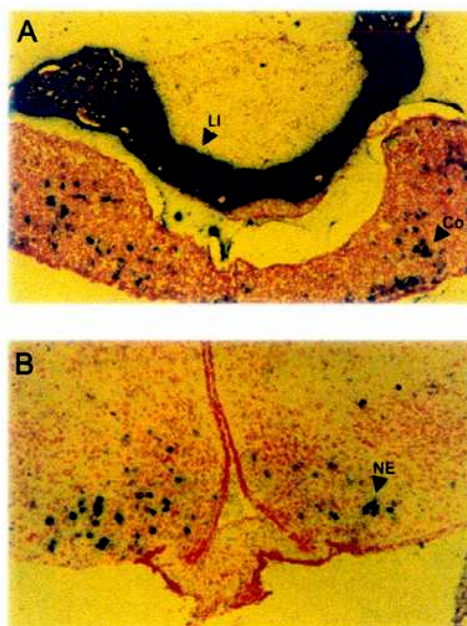


Figura 25: Hibridación *in situ* de ratones transgénicos para -5/+8POMC-EGFP

Cortes coronales de hipófisis y cerebro de un animal adulto de la línea #18, transgénica para -5/+8POMC-EGFP. Los cortes se hibridaron con el oligonucleótido E3 (ver figura 2), que está dirigido contra secuencias del exón 3 de POMC. En la foto se muestra uno de los cortes de hipófisis (A), y otro de cerebro en la zona de núcleo arcuato (B). Los puntos negros revelan la presencia de células que expresan POMC. Una vez realizada la hibridación *in situ*, se analizaron cortes seriados de las secciones positivas de cerebro para POMC. En ningún caso se detectó presencia de EGFP en hipotálamo. Abreviaturas: LI, lóbulo intermedio; Co, corticotropos; NE, neuronas endorfinérgicas.

En la figura 27 se muestra el patrón de expresión de EGFP en cortes coronales de la cabeza un animal P1 de la línea generada con el transgén -13/+8POMC-EGFP. Como se observa, la expresión fue detectada tanto en hipófisis como en el núcleo arcuato.

Para determinar si las neuronas que expresan EGFP son las endorfinérgicas, se hizo un ensayo de colocalización con un anticuerpo policlonal anti β -endorfina (figura 28). Los resultados muestran muy claramente que aproximadamente el 95% de las neuronas que expresan POMC en hipotálamo pueden transducir el gen endógeno de POMC. Por lo

tanto, este control realizado, nos permitieron acotar la resolución del elemento nPOMC, acuatnte en cis, a una resolución de 4kb.

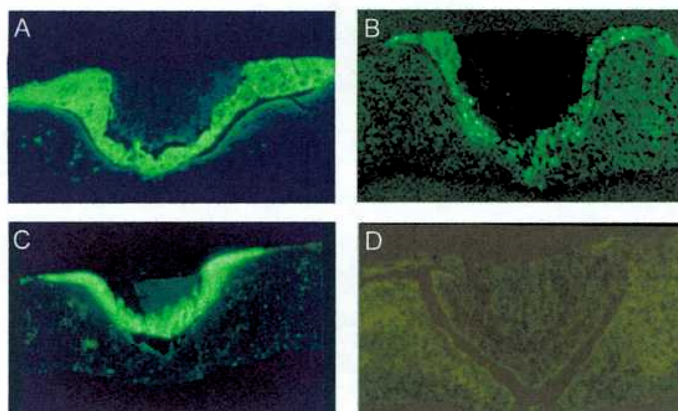


Figura 26: Detección de EGFP en hipófisis transgénicas para $-9/+8$ POMC-EGFP. Cortes de hipófisis de animales adultos de las líneas #1 (A), #7 (B), #4 (C) y # 8 (D) visualizados en el microscopio de fluorescencia.

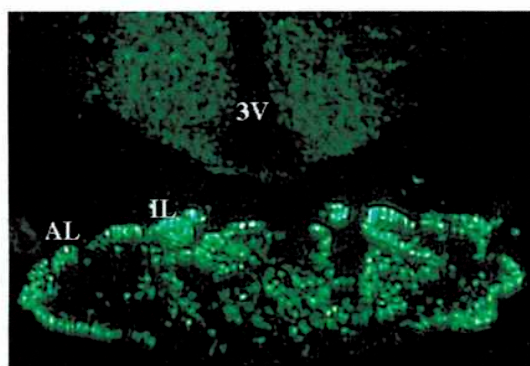


Figura 27: Detección de EGFP en embriones transgénicos $-13/+8$ POMC-EGFP Expresión del gen $-13/+8$ POMC EGFP en una sección coronal de cerebro de un embrión transgénico (e14.5). La fluorescencia verde es evidente en neuronas que rodean al tercer ventrículo del hipotálamo medio basal y en el los lóbulos anterior y medio de la hipófisis en desarrollo. Abreviaturas: 3V, tercer ventrículo; IL, lóbulo intermedio y AL, lóbulo anterior.

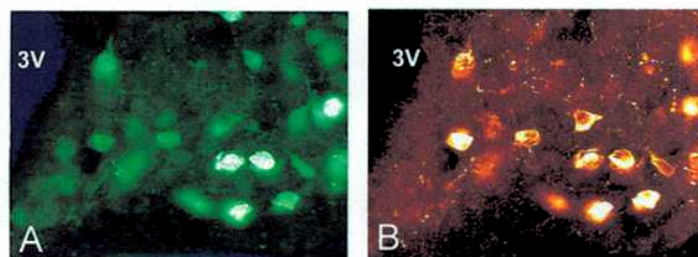


Figura 28: Ensayo de colocalización en núcleo arcuato de animales adultos transgénicos para -13/+8POMC-EGFP

(A), Expresión de EGFP en núcleo arcuato de un animal adulto transgénico para -13/+8POMC-EGFP. (B), la misma sección luego de un análisis inmunohistoquímico utilizando un antisuero anti β -endorfina, un suero de cabra biotilado anti-conejo como anticuerpo secundario y un conjugado estreptoavidina-Cy3 como fluoróforo. Abreviaturas: 3V, tercer ventrículo.

Oncogénesis dirigida en ratones transgénicos

La ausencia de una línea celular neuronal que exprese POMC impide, por el momento, identificar las interacciones que ocurren entre el elemento nPOMC, actuante en *cis*, y los factores de transcripción específicos necesarios para activar la transcripción de POMC en neuronas. Considerando que hoy contamos con una herramienta que nos permite dirigir la expresión de genes heterólogos a neuronas del núcleo arcuato que expresan POMC, hemos desarrollado una estrategia que nos permitiría inmortalizar neuronas de POMC a partir de cultivos primarios hipotalámicos de ratones. Esta estrategia está basada en el direccionamiento de la expresión de un oncogén a neuronas hipotalámicas de POMC en ratones transgénicos, mediante el empleo de un promotor tejido específico. El oncogén utilizado es el antígeno largo T del virus SV40 (AgT), que interfiere en la regulación del ciclo celular bloqueando el control de la proteína p53. Para evitar que las células a las cuales se dirige la expresión del AgT desarrollen tumores tempranamente y progresen hacia estadios de indiferenciación, se optó por utilizar una variante de este gen que produce una proteína termosensible, el antígeno T tsA58. Esta versión del AgT es

termolábil a la temperatura corporal del ratón. Por lo tanto, permitiría aislar cultivos primarios e inmortalizarlos a una temperatura permisible de 33,5 °C, para luego crecerlos en condiciones no permisivas y recuperar el estadio de diferenciación.

Para lograr el objetivo propuesto se construyó un transgén insertando el gen tsA58 en segundo exón del gen de POMC, previo al inicio de la traducción (figura 29). Este transgén, -13/+8POMC-tsA58, también contiene 13 kb de la región 5'flanqueante, la unidad transcripcional completa (6kb) y 2 kb de la región 3'flanqueante del gen de POMC. Estas secuencias, como ha sido demostrado en experimentos previos (Young *et al.*, 1998) y en el presente trabajo con el transgén -13/+8POMC-EGFP, pueden direccionar eficientemente la expresión de genes a neuronas hipotalámicas de POMC.

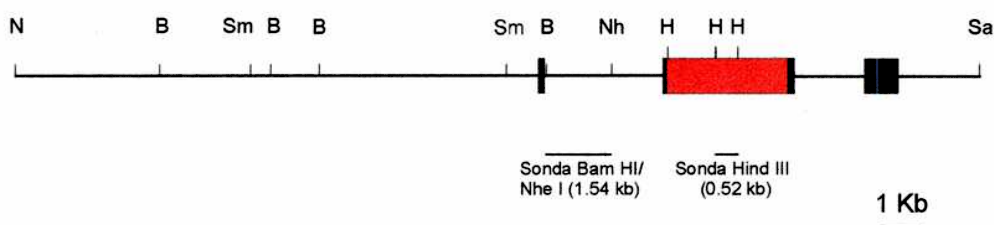


Figura 29 : Transgén utilizado para dirigir oncogénesis a neuronas endorfinérgicas

El transgén -13/+8POMC-tsA58, generado para dirigir oncogénesis a neuronas endorfinérgicas, se construyó insertando una versión termosensible del gen del AgT (tsA58) del virus SV40 en el exón 2 de POMC, previo al ATG que demarca el inicio de la traducción. Símbolos: rectángulos negros, exones de POMC; rectángulo rojo, gen tsA58 del virus SV40; línea azul, oligonucleótido heterólogo de 30 pb insertado en el exón 3; líneas negras, intrones y regiones flanqueantes de POMC. Abreviaturas: B, *Bam*HI; H, *Hind*III; N, *Not*I; Nh, *Nhe*I; Sa, *Sal*I; Sm, *Sma*I.

El transgén se microinyectó en el pronúcleo de embriones de ratón y se transfirió a hembras pseudopreñadas. Los animales nacidos se analizaron para la presencia del transgén por PCR, utilizando la misma estrategia para diagnosticar los transgenes utilizados en el análisis delecional previo (figura 21). De un total de 13 ratones nacidos,

se diagnosticaron 4 animales transgénicos (figura 30A), 3 hembras (#1, #2 y #12) y un macho (#10).

Estos resultados se confirmaron por un *Southern blot* hibridado con la sonda *Bam*HI/*Nhe*I, correspondiente al intrón 1 del gen de POMC (figura 30B).

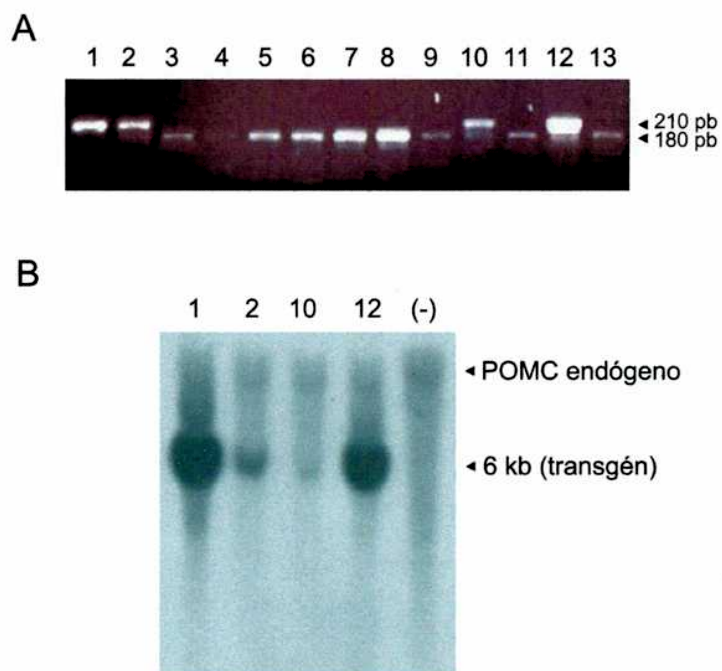


Figura 30: Detección de animales transgénicos para -13/+8POMC-EGFP

(A): PCR de muestras de ADN de una camada de ratones nacidos a partir de embriones microinyectados con el transgén -13/+8POMC-tsA58. Los F0 #1, #2, #10 y #12 resultaron transgénicos. Los primers utilizados fueron el #329 (sentido) y el #330 (antisentido), que aparean sobre el exón 3 de POMC (ver figura 21). (B): *Southern blot* de muestras de ADN digeridas con *Bam*HI de los ratones F0 #1, #2, #10 y #12, transgénicos por PCR. Para hibridar se utilizó una sonda radiactiva *Bam*HI/*Nhe*I de 1.54 kb, correspondiente al intrón 1 del gen de POMC (ver figura 19).

Todos los animales transgénicos obtenidos se pusieron a aparear para generar los distintos pedegrees. Infelizmente, las hembras murieron durante el intento a la edad de 8

semanas. Las autopsias de los cadáveres de estos animales revelaron la presencia de tumores en el área hipofisaria–hypotalámica.

El macho F0 #10 logró dejar varios descendientes transgénicos F1, que permitieron establecer esta única línea. Sin embargo, a las 12 semanas de edad el macho F0 #10 empezó a perder peso y a exhibir una protuberancia craneal de importancia. A los pocos días murió, probablemente debido a la compresión cerebral ejercida por el tumor desarrollado en el área hipofisaria–hypotalámica.

En total, el macho F0 #10 dejó una descendencia de 17 crías F1 transgénicas, 9 hembras y 8 machos. Cuatro de esas hembras se pusieron a aparear a las 5 semanas de vida. A las 9 semanas, todas ellas, pese a poseer síntomas evidentes de tumores (protuberancia craneal y bajo peso), lograron parir crías. Sin embargo, 3 de las hembras no sobrevivieron el período de lactancia (murieron entre la semana 10 y 11) y la cuarta, a pesar de haberlo resistido con dificultad murió en la semana 13. Contrariamente, las hermanas transgénicas no apareadas empezaron a manifestar síntomas de tumor al tercer mes y murieron todas entre el tercer y cuarto mes. Los machos parecen ser más resistentes a los tumores. En general pueden ser apareados sin problemas a partir de la semana 7 de vida y en varios casos mostraron capacidad de copular hembras aún con síntomas evidentes de tumor. En general resisten hasta el quinto mes sin problema. Por lo tanto, la expansión del pedigree se realizó siempre por medio de machos jóvenes.

En la figura 31A se muestra como se observa el avance del tumor fenotípicamente. El primer síntoma de tumor se detecta por la protuberancia que sale de la parte superior del cráneo, como se observa en el ratón de la izquierda; posteriormente, los animales avanzan hacia un cuadro donde muestran una gran pérdida de peso, dificultades para movilizarse, curvatura a nivel de la espina dorsal y lógicamente, una mayor protuberancia (figura 31A, izquierda y figura 31B).

Cuando se disecciona el cerebro de los animales con síntomas avanzados del tumor, se puede detectar que la protuberancia surge como consecuencia del crecimiento desmesurado de la zona hipofisaria–hipotalámica en la base del cráneo. A simple vista o utilizando una lupa, no es posible diferenciar entre hipotálamo e hipófisis. De hecho, ambas partes no pueden separarse en estos ratones. Sin embargo, sí pueden separarse

juntas del resto del cerebro. Cuando esto se realiza queda en evidencia una hendidura debido a la compresión ejercida.

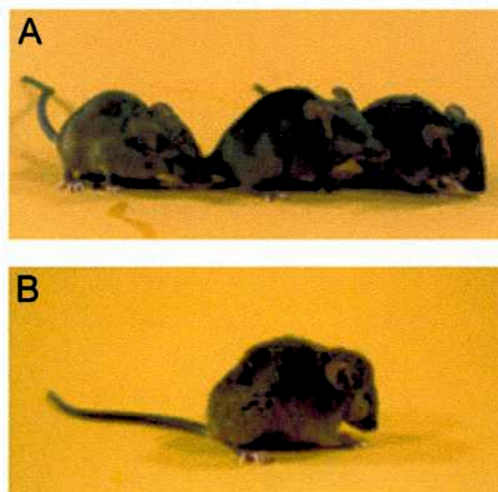


Figura 31: Ratones transgénicos con tumores en la región hipofisaria–hipotalámica

(A): A la izquierda se muestra un ratón transgénico para $-13/+8POMC-tsA58$ con una pequeña protuberancia craneal, primer síntoma visible del tumor en la zona hipofisaria–hipotalámica. A la derecha se muestra otro ratón transgénico para $-13/+8POMC-tsA58$ con síntomas más avanzados del tumor, una protuberancia craneal de gran tamaño y curvatura a nivel de la espina dorsal. En el centro se muestra un ratón *wild type*. (B): Se muestra otra posición del ratón transgénico mostrado en (A) con síntomas avanzados del tumor hipofisario–hipotalámico.

Expresión de tsA58 en tumores

Para detectar la expresión del tsA58, se hizo un *Northern blot* a partir de ARN total extraído de hipófisis e hipotálmos de animales transgénicos jóvenes, aún sin síntomas de tumor, y tumores de animales con la enfermedad avanzada. También se incluyeron muestras de hipófisis e hipotálamo de animales no transgénicos. El *Northern blot* se hibridó con una sonda preparada a partir de un fragmento *HindIII* de 526 pb correspondiente a una región interna del tsA58 (figura 32A) y posteriormente con una

sonda de 200 pb correspondiente al exón 3 de POMC (figura 32B), obtenida por PCR a partir de ADN genómico de ratón con el mismo set de primers utilizados para realizar el screening de animales transgénicos (ver figura 21). Se encontró una fuerte expresión de tsA58 en dos tumores de la zona hipotalámica–hipofisaria de ratones F1 transgénicos, una hembra y un macho, ambos de 14 semanas y en estado avanzado de la enfermedad, y en una hipófisis de un animal F2 transgénico de sólo 6 semanas, aún sin síntomas evidentes de tumor. Las bandas visualizadas coincidieron, en todos los casos, con la banda correspondiente al AgT de un control de ARN total extraído de células COS. Contrariamente a lo esperado, no se detectó expresión de tsA58 en hipotálamos de 2 ratones macho transgénicos de 6 semanas sin síntomas de tumor, aún luego de largos tiempos de exposición. Tampoco, y como era de esperarse, se detectó expresión de tsA58 en muestras de ARN total de hipófisis e hipotálamos de ratones no transgénicos.

Es probable que la poca cantidad de neuronas hipotalámicas de POMC en núcleo arcuato (aproximadamente 3000) no sea suficiente para detectar expresión de tsA58 por *Northern blot*. De hecho, mientras en los tumores de la zona hipotalámica–hipofisaria y las pituitarias transgénica y no transgénica se expresan grandes cantidades de POMC, en hipotálamos, ya sean transgénicos o no transgénicos, sólo es posible visualizar una banda muy tenue correspondiente al ARNm de este gen luego de grandes períodos de exposición (no mostrado).

Diagnóstico histológico de los tumores

Para analizar el tipo de tumor existente en los animales transgénicos, se extrajeron cerebros conjuntamente con hipófisis de animales perfundidos previamente con paraformaldehído. Los cerebros se sometieron a cortes coronales y se tiñeron con hamatoxilina–hematoxilina o se sometieron a ensayos de inmunohistoquímica.

En la figura 33 se muestran las tinciones de tumores con eosina–hematoxilina. Se puede observar que la masa tumoral, que se tiñe en forma mucho más intensa, parecería crecer en forma encapsulada y se expande de forma tal que ejerce presión en la parte superior del hipotálamo, lo que probablemente produzca las protuberancias craneales típicas.

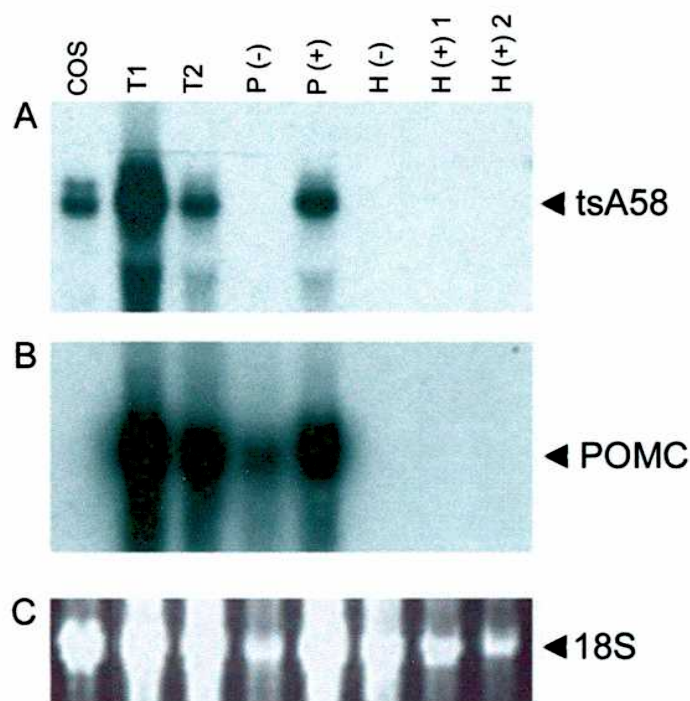


Figura 32: Expresión de tsA58 en ratones transgénicos

Análisis por *Northern blot* de muestras de ARN obtenidas de tumores de la zona hipofisaria-hipotalámica de animales de 14 semanas de edad (T1 y T2), de pituitarias transgénicas de ratones de 6 semanas (P (+)), pituitaria no transgénica (P(-)), hipotálamos transgénicos de animales de 6 semanas (H (+) 1 y H (+) 2) e hipotálamo no transgénico (H (-)). Como control positivo de AgT se incluyó ARN de células COS. El ARN total fue separado por electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes y transferido a membranas de Nylon, posteriormente hibridadas en forma secuencial con una sonda *Hind*III de 0.52 kb del gen tsA58 (ver figura 29) marcada radiactivamente (A) y un fragmento de 200 pb del exón 3 del gen POMC, también marcado con radiactivo, levantado por PCR a partir de ADN genómico de ratón, utilizando los primers 329 (sentido) y 330 (antisentido, ver figura 21). En C se muestra como control de masa, la banda correspondiente al ARNr 18S teñida con bromuro de etidio luego de la separación electroforética.

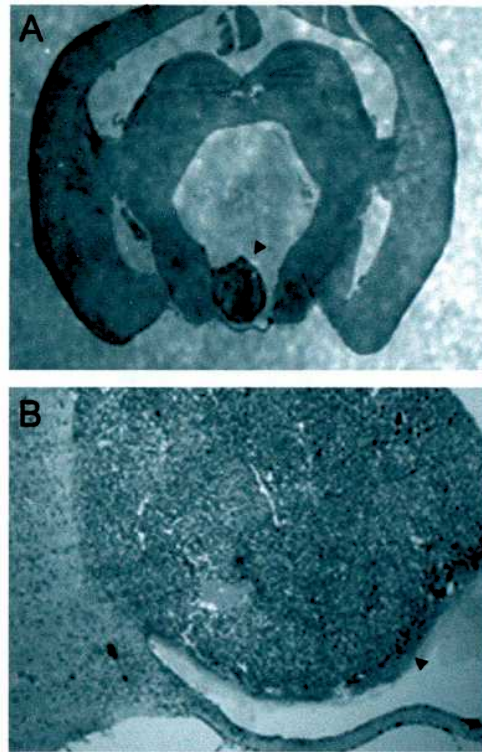


Figura 33: Histología de tumores de ratones transgénicos para $-13/+8POMC-tsA58$
(A): Corte coronal de cerebro de un ratón transgénico con síntomas evidentes de tumor, a la altura de la zona hipofisaria-hipotalámica. La flecha indica la masa tumoral que crece en forma encapsulada y ejerce compresión sobre la base del cerebro produciendo protuberancias craneales. En (B) se muestra la zona tumoral, también señalada con una flecha, con mayor aumento.

CONCLUSIONES

La primer parte de este trabajo apunta a la puesta a punto de las diferentes etapas de la producción de ratones transgénicos. En estos últimos cinco años se han generado las condiciones adecuadas para la producción de ratones transgénicos en un laboratorio de nuestro país. Hemos sido los primeros en Sudamérica en utilizar esta tecnología. La eficiencia de transgénesis a lo largo de este período varió entre un 6 y un 30% de los ratones nacidos de acuerdo al transgén microinyectado. Estos porcentajes son similares a los obtenidos en otros laboratorios del mundo.

La puesta a punto de estas técnicas nos ha permitido estudiar las secuencias regulatorias de dos genes en particular, el gen de β -caseína, con vistas a un proyecto biotecnológico de gran envergadura, y el gen de POMC, con vistas a un proyecto básico muy ambicioso que pretende identificar secuencias en *cis* y factores de transcripción específicos de neuronas.

Una vez generadas las condiciones necesarias para la producción de animales transgénicos, haciendo hincapié en esta técnica, se procedió a estudiar la región 5'flanqueante del gen de β -caseína bovino para un posible uso de la mismas en proyectos que contemplen la utilización de la glándula mamaria de animales de granja como bioreactores productores de proteínas humanas de uso terapéutico.

El ratón constituye un excelente modelo para el estudio de promotores porque se pueden obtener resultados a corto plazo y a un costo no tan elevado, ya que posee intervalos generacionales muy cortos y es posible albergar un gran número de ellos en pequeñas salas acondicionadas. Por otra parte, los resultados obtenidos en ratón son generalmente muy reproducibles en animales de granja.

Cuando empezamos con el proyecto, sabíamos que en experimentos de transfección estable había sido demostrado que las secuencias proximales del promotor bovino de β -caseína eran capaces de dirigir la expresión específica de genes reporteros a una línea celular derivada de la glándula mamaria. Los eventos transcripcionales resultaron ser muy dependientes de los componentes de la matriz extracelular y de un balance definido de hormonas lactogénicas (Schmidhauser *et al.*, 1990).

Sin embargo, a pesar que los sistemas de cultivo *in vitro* son muy sencillos para estudiar la expresión de genes de mamíferos, muchas veces, los promotores previamente estudiados en sistemas celulares no reproducen los mismos resultados en el mismo tipo celular o presentan expresión ectópica cuando son expresados en ratones transgénicos (Günzburg *et al.*, 1991; Low *et al.*, 1986; Zack *et al.*, 1991). De hecho, en estudios *anteriores* se demostró que la mayoría de los ratones transgénicos que llevan genes de fusión con 1,79 (Maga *et al.*, 1994) o 1,72 kb (Ninomiya *et al.*, 1994) del promotor bovino de β -caseína no expresan el transgén en glándula mamaria, a pesar que esos promotores habían resultado funcionales en líneas celulares de glándula mamaria (Schmidhauser *et al.*, 1990).

Nosotros construimos un transgén fusionando a secuencias 5'flanqueantes del gen de β -caseína bovino con hGH. Los transgenes fueron microinyectados en pronúcleos de ovocitos fertilizados y posteriormente transferidos a hembras pseudopreñadas. Se lograron identificar en total 3 ratones transgénicos que heredaron el transgén a generaciones posteriores y se establecieron las respectivas colonias independientes. Los tres linajes fueron analizados en forma extensiva.

Mediante un RIA de muestras de leche fue determinada en forma cuantitativa la capacidad de direccionar la expresión de hGH a glándula mamaria de las secuencias 5'flanqueantes del gen bovino de β -caseína. En dos de las tres líneas se detectaron niveles altos (en el orden de mg/ml) de hGH de acuerdo a datos previos obtenidos de la literatura (Gordon *et al.*, 1987; Archibald *et al.*, 1990; Meade *et al.*, 1990), pese a llegar en el mejor de los casos al 20% de expresión endógena de β -caseína en bovinos. En una de las líneas se encontraron niveles muy bajos de hGH, aproximadamente 100 veces menores a los niveles encontrados en las dos líneas restantes. Considerando el número de copias del transgén que se insertaron en tándem en cada línea, los datos cuantitativos de expresión de hGH en leche indican que hay un fuerte efecto del sitio de inserción sobre la expresión de los transgenes. Por lo tanto, el nivel de expresión de hGH no está correlacionado con el número de copias insertadas en tándem. Esto indica a priori, la falta de ciertos elementos regulatorios en las secuencias 5'flanqueantes utilizadas, probablemente compartidos con otros genes de la misma familia ubicados en el mismo locus de 200 kb. Hasta el momento, en la literatura sólo existía un ejemplo de expresión transgénica

precisa en glándula mamaria de ratón dirigida por secuencias de β -caseína bovina, utilizando un fragmento genómico de 33 kb, incluyendo 16 kb de la región 5'flanqueante y 8 kb de la región 3'flanqueante. Con este fragmento se lograron altos niveles de expresión en el 50% de las líneas analizadas (Rijnkels *et al.*, 1995).

Los estudios de expresión espacial y temporal del transgén se han llevado a cabo solamente con muestras de las líneas #3 y #50 que son las que expresaron niveles considerables de hGH. Si bien no se ha detectado expresión ectópica en ninguno de los tejidos analizados por *Northern blot*, en ambas líneas se encontraron niveles bajos de hGH en circulación. Es posible que la fuente de hGH en circulación sean los linfocitos T citotóxicos, ya que ha sido descrita la expresión de β -caseína en estas células (Grusby *et al.* 1990). Sin embargo, no es prudente descartar un cierto grado de expresión ectópica que puede ser el resultado de una mínima expresión basal en diferentes tejidos. No obstante, estos niveles de hGH en circulación son bajos como para producir los trastornos fisiológicos observados en ratones que sobreexpresan hGH en circulación (Brem *et al.*, 1989). En todas las líneas obtenidas hasta el momento no se ha detectado mayor crecimiento de los animales transgénicos durante la pubertad. Por otra parte, las hembras transgénicas parecerían no ver afectada su fertilidad.

El patrón de expresión temporal del transgén resultó ser similar al de β -caseína bovina. En bovinos, tal cual fue descrito por Goodman y Schanbajer (1991), el nivel de ARNm de β -caseína durante la gestación es bajo y se incrementa en forma abrupta al comenzar la lactogénesis. En ratones, la expresión de β -caseína empieza a detectarse en el día 10 de la preñez y no se observa aumento significativo en la expresión de β -caseína luego del parto (Persuy *et al.*, 1992). Estos datos indican que el transgén sigue el patrón de expresión temporal bovino y esto estaría determinado por elementos regulatorios presentes dentro de la región 5'flanqueante del gen bovino y no por el entorno del ratón.

Otra característica importante observada cuando se analizó la actividad transcripcional del transgén resultó ser el patrón homogéneo de expresión en todos los lóbulos de la glándula mamaria. Contrariamente a lo ocurrido con otros transgenes, incluido el de β -globulina bovino (Faerman *et al.*, 1995), el promotor de β -caseína bovina induce la expresión del gen hGH en todas las células epiteliales de la glándula mamaria, independientemente de los niveles de expresión del tejido o del genotipo homocigota o

heterocigota para el transgén. El mosaicismo celular queda evidenciado cuando se observa un patrón heterogéneo de expresión en comparación a un patrón homogéneo del gen endógeno. Esto probablemente se deba a un patrón de metilación tipo mosaico, mucho más frecuente en promotores incompletos que tienen un bajo nivel de penetrancia en el tejido (Bradl *et al.*, 1991; Faerman *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1992; McGowan *et al.*, 1989).

El *Southern blot* de la línea #3 que fue hibridado con la sonda del gen de hGH muestra dos bandas adicionales. Cuando se hibrida con un fragmento de las secuencias 5'flanqueantes del gen bovino de β -caseína aparece una única banda del tamaño correcto. Es probable que haya ocurrido un evento recombinatorio poco común que haya afectado una de las copias del transgén a nivel del gen hGH pero no las secuencias 5'flanqueantes. Este evento recombinatorio raro habría generado un transcrito de mayor tamaño que el normal, tal cual se observa en los *Northern blots* donde se corrieron muestras de ARN de glándula mamaria de la línea #3. Por otra parte, este transcrito puede ser traducido y formar una proteína de mayor peso molecular, capaz de ser reconocida por un antisuero específico contra hGH como puede observarse en el *Western blot*.

Resumidos los resultados obtenidos, podemos decir que los elementos en *cis* que actúan en las vecindades de la unidad transcripcional de los genes controlan cuatro aspectos principales para determinar una expresión apropiada, y éstos son (1) el patrón espacial, (2) el patrón temporal y del desarrollo, (3) el patrón de regulación hormonal, y (4) los niveles de expresión en cada célula y a cada tiempo.

Nosotros logramos demostrar que el promotor de β -caseína bovino de 3,8 kb es capaz de controlar los primeros tres aspectos de la expresión de un gen, pero los niveles de expresión no son constantes o apropiados en todos los pedigrees generados. Por lo tanto, la frecuencia con que ocurren eventos transcripcionales apropiados es altamente dependiente del contexto cromosómico en los alrededores del sitio de inserción. Los factores específicos que actúan en *trans* son capaces de reconocer los sitios que actúan en *cis* sólo cuando éstos se encuentran en una configuración cromatinica abierta (Al-Shawi *et al.*, 1990). Cuando se analizan los niveles de expresión de un transgén, la independencia del sitio de inserción y dependencia del número de copias no se cumplen frecuentemente. Para lograr tal objetivo, los transgenes deberían portar secuencias que los

aislen de influencias producidas por regiones vecinas de ADN, y por lo tanto le confieran independencia transcripcional. En algunos casos, las secuencias MARs (matrix attachment regions) del gen de lisozima de pollo son capaces de conferir independencia posicional a los transgenes, constituyéndose éstas en el borde activo entre cromatina transcripcionalmente activa e inactiva (Bonifer *et al.*, 1990; Phi-Van y Strätling, 1988). Sin embargo, muchos intentos resultaron parcialmente efectivos (Barash *et al.*, 1996; McKnight *et al.*, 1996).

Para solucionar el efecto posicional que se observa con este promotor, es necesario encontrar elementos controladores de locus (LCRs) que probablemente comanden la actividad transcripcional de todo el locus de caseínas. Estos elementos han sido descritos para la familia de las globinas (Grosveld *et al.*, 1987; Strouboulis *et al.*, 1992) y probablemente se encuentren muy lejos del inicio de transcripción de β -caseína.

Uno de nuestros objetivos en el laboratorio, como fue expuesto anteriormente, es utilizar la información obtenida para expresar transgenes de valor comercial en animales transgénicos de granja. Los niveles de expresión obtenidos con el transgén 3,8b β -cas/hGH son suficientes como para encarar proyectos biotecnológicos y utilizar la glándula mamaria de cabras o vacas para producir proteínas de uso terapéutico en leche. Hay varias empresas en el mundo intentando producir proteínas terapéuticas en leche de vacas, cabras, ovejas, cerdos y conejos. La más importante es Genzyme Transgenics que produce en cabras varios anticuerpos monoclonales, antitrombina III, angiogenina, interferón beta, factor X, entre otras. Actualmente estas proteínas se encuentran en ensayos clínicos, estando las más avanzadas en fase III.

Las ventajas son innumerables y un excelente ejemplo es el de Cruz Roja Americana que desde hace varios años ha estado produciendo proteínas humanas de suero en leche de animales transgénicos. Una de ellas es la proteína C, un anticoagulante de suero que recientemente ha sido producida exitosamente en leche de cerdo (Velandar *et al.*, 1997; Subramanian *et al.*, 1996). Los enfermos que carecen de esta proteína sólo pueden acceder a un producto muy caro purificado a partir de suero humano de donantes, ya que la proteína no ha podido ser generada con éxito en cultivos celulares porque su procesamiento post traduccional es muy complejo. Considerando una pérdida del 50% durante el proceso de purificación, en los Estados Unidos sólo es posible contar con 12

kg anuales de proteína C. Esto es muy poco comparado con los 84 kg necesarios. La utilización de la glándula mamaria de cerdos constituyó una alternativa muy eficiente para producir proteína C, a un bajo costo y sin peligro de contagio de enfermedades. Con un pequeño número de cerdos quedaría satisfecha la demanda de proteína C.

Experimentos realizados por nuestro grupo en los últimos años demostraron que los requerimientos transcripcionales del gen de POMC a nivel neuronal son diferentes a los necesarios a nivel endócrino (Rubinstein *et al.*, 1993; Young *et al.*, 1998). Nuestro objetivo general es entender porqué un mismo gen sufre una regulación transcripcional distinta en tejidos de origen diverso y nuestra hipótesis de trabajo sugiere que cada tipo celular controlaría la especificidad transcripcional, al menos en parte, mediante mecanismos moleculares independientes.

Hasta el comienzo del presente trabajo se había realizado un análisis delecional que permitió ubicar un elemento responsable de la expresión neuronal de POMC (nPOMC) en un fragmento de 11 kb comprendido entre -2 y -13 kb del inicio de la transcripción (Young *et al.*, 1998).

En este trabajo se continuó con el análisis delecional de las secuencias 5'flanqueantes, y se ubicó el elemento regulatorio nPOMC dentro a una resolución de 4kb. A diferencia de estudios anteriores, hemos incorporado la tecnología de las proteínas fluorescentes. Esto constituye una ventaja importante, ya que se evitan las hibridaciones *in situ*, si bien son muy eficientes para realizar estudios de expresión, los resultados se obtienen entre 3 y 4 semanas después de realizado el experimento, debido a los largos tiempos de exposición. En este trabajo se utilizó una versión mamiferizada de la proteína EGFP, que contrariamente a lo que ocurre con la proteína wild type, tiene máxima expresión en células de mamífero. Esto se debe a que tiene mutaciones puntuales para aprovechar los codones más frecuentes en mamíferos.

La ventaja en utilizar EGFP es que a medida que se van realizando los cortes de material, se pueden ir visualizando las secciones para detectar fluorescencia. Con esta estrategia hemos determinado que el elemento nPOMC se encuentra en la porción distal de las secuencias 5'flanqueantes del gen de POMC, entre -9 y -13 kb del inicio de la transcripción.

En total se evaluaron 4 líneas de cada una de las construcciones $-5/+8\text{POMC-EGFP}$ y $-9/+8\text{POMC-EGFP}$. En ninguna de ellas se encontró expresión de EGFP en neuronas del núcleo arcuato. Sin embargo, 3 líneas de cada una de las construcciones expresaron EGFP en lóbulo intermedio (melanotrofos) y lóbulo anterior (corticotrofos) de la hipófisis.

El patrón de expresión se pareció mucho al obtenido en estudios previos con el transgén $-2/+8\text{POMC}^*$ (Rubinstein *et al.*, 1993), donde se detectó que ninguna de las 6 líneas transgénicas obtenidas expresaba el transgén en núcleo arcuato. En este caso, se había detectado expresión hipofisaria en las 6 líneas estudiadas. Sin embargo, en el presente estudio no se detectó ningún tipo de expresión de EGFP en una de las líneas de cada construcción, contrariamente a lo esperado. En ambos casos, los F0 diagnosticados resultaron dudosos, debido a la baja intensidad de la banda amplificada por PCR a partir del transgén. Cuando se hizo un análisis por *Southern blot*, no se detectó ninguna banda de ADN proveniente del F0 #13, nacido a partir de una cigota inyectada con el transgén $-5/+8\text{POMC-EGFP}$. En este caso supusimos que el resultado negativo se debía a un alto grado de mosaicismo sumado a un bajo número de copias del transgén insertadas en el tándem. No se puede descartar también que algún evento recombinatorio haya deletado la porción del transgén homóloga a la sonda utilizada en el *Southern blot*. Esta línea se consideró transgénica cuando se detectó progenie transgénica por PCR. Con respecto al F0 #8, nacido a partir de una cigota inyectada con el transgén $-9/+8\text{POMC-EGFP}$, la detección fue dudosa, pero por *Southern blot* se pudo detectar una banda correspondiente al transgén. Es muy probable que la falta de expresión en estas líneas se deba o a un efecto posicional, poco común según los estudios previos (Rubinstein *et al.*, 1993; Young *et al.*, 1998), o a un bajo número de copias insertado que generan una cantidad de transcripto de EGFP por debajo del umbral de detección.

En ninguno de los dos casos se realizaron estudios para determinar la integridad del transgén por considerar que con los otros resultados era suficiente como para alcanzar nuestro objetivo.

Para descartar que la falta de visualización de EGFP en el núcleo arcuato no se deba a una cuestión particular de ese tipo celular que no permite que la proteína se exprese o emita fluorescencia, se construyó un transgén con las mismas secuencias flanqueantes

que el transgén -13/+8POMC* (Young *et al.*, 1998), que previamente se demostró que se expresa correctamente en hipotálamo, mas precisamente en neuronas endorfinérgicas, y se generó una línea transgénica. En este caso, la EGFP se expresó correctamente, tanto en hipófisis como en neuronas de POMC y también resultó muy alto el porcentaje de colocalización cuando se hizo una inmunohistoquímica de las células que emitían fluorescencia.

Por último, cabe destacar que es la primera vez que se puede dirigir la expresión en forma precisa de un gen de fusión a neuronas endorfinérgicas del núcleo arcuato. Previamente, todos los intentos exitosos se habían hecho con fragmentos genómicos de POMC (Young *et al.*, 1998).

Uno de los objetivos del laboratorio a largo plazo consiste en identificar la secuencia nPOMC a través de estudios de interacción ADN/proteína: ensayos de retardamiento de geles, Southwestern *in situ* y protección a la DNasa I, y clonar factores de transcripción neuronales específicos de POMC. Para lograr tal objetivo es necesario una línea celular de neuronas de POMC hipotalámicas. Como contamos con una poderosa herramienta para direccionar la expresión de genes a dichas neuronas del núcleo arcuato, planeamos, mediante oncogénesis dirigida en ratones transgénicos, generar nuestra propia línea celular.

Par comenzar con este trabajo dirigimos la expresión del AgT tsA58 a neuronas de POMC. En total se detectaron 4 animales transgénicos. El objetivo era inmortalizar *in vitro* neuronas de POMC a través de explantes hipotalámicos embrionarios. Sin embargo, sólo fue posible establecer una línea de las cuatro, debido a que los ratones, pese a tener la variante termosensible del AgT, desarrollaron tumores en el área hipotalámica-hipofisaria a temprana edad. En el *Southern blot* se pudo constatar que el F0 #10 era la que menos números de copia del transgen en tándem llevaba insertado. Este transgén, según se describió anteriormente, tiene penetrancia del 100% y probablemente su expresión es independiente de la zona de inserción. Por lo tanto, es factible que en los animales con alto número de copias se produzca tsA58 abundante, y que esto determine la generación de tumores prematuros, pese a que la temperatura es no permisiva.

Los ratones transgénicos de la línea #10 también desarrollaron tumores, aunque un poco más tarde. Esto permitió que la línea se expandiera a través de los machos que parecería

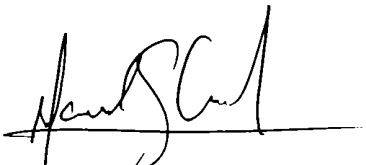
ser más resistentes. Resulta muy complicado aparear hembras. En la mayoría de los casos mueron antes de finalizar el desteto o directamente no tienen cría.

En los animales de la línea #10 se hicieron los primeros estudios del tumor. Aparentemente crece como una masa hipofisaria-hipotalámica en forma encapsulada. Esto ejerce presión sobre la parte basal del cerebro hacia arriba, generando una protuberancia craneal que parecería ser diagnóstica del estado de avance del tumor.

En tumores jóvenes y avanzados se ha detectado expresión de tsA58 y de POMC. Esto último es un buen marcador de que las células no están sufriendo un proceso de dediferenciación, lo que resulta fundamental si consideramos nuestros objetivos finales, ya que requerimos abundante cantidad de los factores de transcripción deseados en la línea celular para poder clonarlo.

Por el momento no logramos determinar si el tumor proviene de células hipofisarias o hipotalámicas o de ambas, ya que aún no se buscaron aún marcadores típicos. Es probable que el tumor se haya originado de ambos tipos celulares. En los próximos meses será determinado.

La cantidad de neuronas endorfinérgicas en núcleo arcuato es muy baja. Son aproximadamente 3000 que se mezclan dentro de varios tipos celulares. Para aislar esas neuronas de otras células intentaremos realizar un triple transgénico, que exprese simultáneamente un oncogén (AgTs-A58), un marcador de selección (*neo*) y un marcador visual fluorescente (EGFP). El promotor de 13 kb de POMC será utilizado para dirigir la expresión de un mRNA bicistónico que codifica para resistencia a G418 y EGFP. Esta estrategia nos permitirá seleccionar fácilmente neuronas de POMC. Por otro lado, la EGFP puede cumplir función de un marcador de diferenciación que puede detectarse sin dañar a las células.



MARCELO CERDÁN



Marcelo Rubiustein

REFERENCIAS

- Al-Shawi R, Kinnaird J, Burke J, Bishop JO (1990): Expression of a foreign gene in a line of transgenic mice is modulated by a chromosomal position effect. *Mol Cell Biol* 10:1192-1198
- Altiok S and Groner B (1993) Interaction of two sequence-specific single-stranded DNA-binding proteins with an essential region of the beta-casein gene promoter is regulated by lactogenic hormones. *Mol Cell Biol* 13:7303-7310.
- Andres AC, Schonenberger CA, Groner B, Henninghausen L, LeMeur M, Gerliner P (1987) Ha-ras oncogene expression directed by a milk protein gene promoter: Tissue specificity, hormonal regulation, and tumor induction in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1299-1303
- Andres AC, van der Valk, MA, Schonenberger CA, Fluckiger F, LeMeur M, Gerliner P, Groner B (1988) Ha-ras and c-myc oncogenes expression interferes with morphological and functional differentiation of mammary epithelial cells in single and double transgenic mice. *Genes Dev* 2:1486-1495
- Archibald AL, McClenaghan M, Hornsey V, Simons JP, Clark A (1990) High-level expression of biologically active human α 1-antitrypsin in the milk of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5178-5182
- Ball RK, Friis RR, Schoenenberger CA, Doppler W, and Groner B (1988) Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J* 7:2089-2095.
- Barash I, Ilan N, Kari R, Hurwitz DR, Shani M (1996): Co-integration of β -lactoglobulin/human serum albumin hybrid genes with the entire β -lactoglobulin gene or the matrix attachment region element: repression of human serum albumin and β -lactoglobulin expression in the mammary gland and dual regulation of the transgenes. *Mol Reprod Dev* 45:421-430
- Bates GP and Davies SW (1997) Transgenic mouse models of neurodegenerative disease caused by CAG/polyglutamine expansions. *Mol Med Today* 3:508-515.
- Bates GP, Mangiarini L, and Davies SW (1998) Transgenic mice in the study of polyglutamine repeat expansion diseases. *Brain Pathol* 8:699-714.
- Bayley SA, Stones AJ, and Smith CG (1988) immortalization of rat keratinocytes by transfection with polyomavirus large T gene. *Exp Cell Res* 177:232-236.
- Bayna EM and Rosen JM (1990) Tissue-specific, high level expression of the rat whey acidic protein gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 18:2977-2985.
- Birren SJ and Anderson DJ (1990) A v-myc-immortalized sympathoadrenal progenitor cell line in which neuronal differentiation is initiated by FGF but not NGF. *Neuron* 4:189-201.
- Bischoff R, Degryse E, Perraud F, Dalemans W, Ali-Hadji D, Thepot D, Devinoy E, Houdebine LM, and Pavirani A (1992) A 17.6 kbp region located upstream of the rabbit WAP gene directs high level expression of a functional human protein variant in transgenic mouse milk. *FEBS Lett* 305:265-268.
- Bishop JF, Rinaudo M, Ritter JK, Conant K, Gehlert DR (1990) A putative AP-2 binding site in the 5' flanking region of the mouse POMC gene. *FEBS Lett* 264:125-129.
- Bleck GT and Bremel RD (1994) Variation in expression of a bovine alpha-lactalbumin transgene in milk of transgenic mice. *J Dairy Sci* 77:1897-1904.

Blom van Assendelft G, Hanscombe O, Grosveld F, Greaves DR (1989) The beta-globin dominant control region activates homologous and heterologous promoters in a tissue-specific manner. *Cell* 56:969-977

Bonifer C, Vidal M, Grosveld F, Sippel A (1990): Tissue specific and position independent expression of the complete gene domain for chicken lysozyme in transgenic mice. *EMBO J* 9:2843-2848

Borchelt DR (1998) Inherited neurodegenerative diseases and transgenic models. *Lab Anim Sci* 48:604-610.

Boutillier AL, Monnier D, Lorang D, Lundblad JR, Roberts JL, Loeffler JP (1995) Corticotropin-releasing hormone stimulates proopiomelanocortin transcription by cFos-dependent and -independent pathways: characterization of an AP1 site in exon 1. *Mol Endocrinol* 9:745-755.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Bradl M, Larue L, Minz B (1991): Clonal coat color variation due to a transforming gene expressed in melanocytes of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6647-6650

Brem G, Hartl P, Besenfelder U, Wolf E, Zinovieva N, and Pfaller R (1994) Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the mammary gland of transgenic rabbits. *Gene* 149:351-355.

Brem G, Wanke R, Wolf E, Buchmuller T, Muller M, Brenig B, Hermanns W (1989) Multiple consequences of human growth hormone expression in transgenic mice. *Mol Biol Med* 1989 6:531-547

Bresciani F (1968) Topography of DNA synthesis in the mammary gland of the C3H mouse and its control by ovarian hormones: An autoradiographic study. *Cell Tissue Kinet* 1:51-63.

Brew K, Vanaman TC, and Hill RL (1967) Comparison of the amino acid sequence of bovine alpha-lactalbumin and hens egg white lysozyme. *J Biol Chem* 242:3747-3749.

Bronstein JM, Hales TG, Tyndale RF, and Charles AC (1998) A conditionally immortalized glial cell line that expresses mature myelin proteins and functional GABA(A) receptors. *J Neurochem* 70:483-491.

Buhler TA, Bruyere T, Went DF, Stranzinger G, Burki K 1990 Rabbit β -casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. *Bio/Technology* 8:140-143

Burdon T, Sankaran L, Wall RJ, Spencer M, and Hennighausen L (1991) Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development. Evidence for different mechanisms of regulation during pregnancy and lactation. *J Biol Chem* 266:6909-6914.

Cairns LA, Crotta S, Minuzzo M, Moroni E, Granucci F, Nicolis S, Schiro R, Pozzi L, Giglioni B, Ricciardi-Castagnoli P, Ottolenghi S (1994) Immortalization of multipotent growth-factor dependent hemopoietic progenitors from mice transgenic for GATA-1 driven SV40 tsA58 gene. *EMBO J* 13:4577-4586

Cairns LA, Crotta S, Minuzzo M, Moroni E, Granucci F, Nicolis S, Schiro R, Pozzi

Cairns LA, Crotta S, Minuzzo M, Ricciardi-Castagnoli P, Pozzi L, and Ottolenghi S (1997) Immortalization of neuro-endocrine cells from adrenal tumors arising in SV40 T-transgenic mice. *Oncogene* 14:3093-3098.

Cerdan MG, Young JI, Zino E, Falzone TL, Otero V, Torres HN, and Rubinstein M (1998) Accurate spatial and temporal transgene expression driven by a 3.8- kilobase promoter of the bovine beta-casein gene in the lactating mouse mammary gland. *Mol Reprod Dev* 49:236-245.

- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, and Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.
- Chambers TJ, Owens JM, Hattersley G, Jat PS, and Noble MD (1993) Generation of osteoclast-inductive and osteoclastogenic cell lines from the H-2KbtsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5578-5582.
- Charron J, Drouin J (1986) Glucocorticoid inhibition of transcription from episomal proopiomelanocortin gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8903-8907.
- Chen KS, Masliah E, Grajeda H, Guido T, Huang J, Khan K, Motter R, Soriano F, and Games D (1998) Neurodegenerative Alzheimer-like pathology in PDAPP 717V-->F transgenic mice. *Prog Brain Res* 117:327-34:327-334.
- Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997) Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138:4489-4492.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-Step of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem*. 162:156-159
- Chu RM, Wang SR, Weng CN, and Pursel VG (1993) Isolation and characterization of porcine milk lactoferrin. *Am J Vet Res* 54:1154-1159.
- Civelli O, Birnberg N, Herbert E (1982) Detection and quantitation of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. *J Biol Chem* 257:6783-6787.
- Civelli O, Birnberg N, Herbert E (1982) Detection and quantitation of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. *J Biol Chem* 257:6783-6787.
- Clark AJ, Bessos H, Bishop JO, Brown P, Harris S, Lathe R, McClenaghan M, Prowse C, Simons JP, Whitelaw CBA, Wilmot I (1989) Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technology* 7:487-492
- Clarke RA, Sokol D, Rigby N, Ward K, Murray JD, Mackinlay AG (1994) Mammary gland specific expression of bovine α s1-casein derived transgenes in mice. *Transgenics* 1:313-319.
- Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, and Ward WW (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green- fluorescent protein. *Biochemistry* 32:1212-1218.
- Cormack BP, Valdivia RH, and Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33-38.
- Cramer A, Whitehorn EA, Tate E, and Stemmer WP (1996) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol* 14:315-319.
- Dalens M, Gellin J (1986) The gene map of the rabbit III. α and β -casein gene syntenry. *Genet Sel Evol* 18:99:105.
- Daniel CW, Silberstein GB (1987) Postnatal development of the rodent mammary gland. In *The mammary gland: Development, regulation, and function* (Neville MC y Daniel CW, eds), pp 3-36. Plenum Press, New York, NY.
- Davies MS, West LF, Davis MB, Povey S, and Craig RK (1987) The gene for human alpha-lactalbumin is assigned to chromosome 12q13. *Ann Hum Genet* 51:183-188.

Devinoy E, Hubert C, Jolivet G, Thepot D, Clergue N, Desaleux M, Dion M, Servely JL, and Houdebine LM (1988) Recent data on the structure of rabbit milk protein genes and on the mechanism of the hormonal control of their expression. *Reprod Nutr Dev* 28:1145-1164.

Devinoy E, Thepot D, Stinnakre MG, Fontaine ML, Grabowski H, Puissant C, Pavirani A, and Houdebine LM (1994) High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transgenic Res* 3:79-89.

DiTullio P, Cheng SH, Marshall J, Gregory RJ, Ebert KM, Meade HM, and Smith AE (1992) Production of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the milk of transgenic mice. *Biotechnology (N Y)* 10:74-77.

Doppler W, Groner B, and Ball RK (1989) Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat beta-casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:104-108.

Doppler W, Hock W, Hofer P, Groner B, and Ball RK (1990) Prolactin and glucocorticoid hormones control transcription of the beta- casein gene by kinetically distinct mechanisms. *Mol Endocrinol* 4:912-919.

Drohan WN, Zhang DW, Paleyanda RK, Chang R, Wroble M, Velander W, and Lubon H (1994) Inefficient processing of human protein C in the mouse mammary gland. *Transgenic Res* 3:355-364.

Drouin J, Trifiro M, Nemer M, Wrangle O (1989) Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol Cell Biol* 9:5305-5314.

Drouin J, Sun YL, Chamberland M, Gauthier Y, De Lean A, Nemer M, Schmidt TJ (1993) Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J* 12:145-156.

Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA, Gordon K 1991 Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Bio/Technology* 9:835-838

Eisenstein RS and Rosen JM (1988) Both cell substratum regulation and hormonal regulation of milk protein gene expression are exerted primarily at the posttranscriptional level. *Mol Cell Biol* 8:3183-3190.

Elkabes S, Loh YP, Nieburgs A, Wray S (1989) Prenatal ontogenesis of pro-opiomelanocortin in the mouse central nervous system and pituitary gland: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* 46:85-95.

Faerman A, Barash I, Puzis R, Nathan M, Hurwitz DR, Shani M (1995): Dramatic heterogeneity of transgene expression in the mammary gland of lactating mice: a model system to study the synthetic activity of mammary epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 43:461-470

Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hraby VJ, Cone RD (1997) Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385:165-168.

Fantl V, Stamp G, Andrews A, Rosewell I, and Dickson C (1995) Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev* 9:2364-2372.

Ferretti L, Leone P, Sgaramella V (1990) Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Res* 1990 18:6829-6833

- Fox PF (1982) Proteolysis in milk and dairy products. *Biochem Soc Trans* 10:282-284.
- Frederiksen PB, Rasmussen JW, Lassen E, Fenger C, Kronborg O, and Ditzel H (1994) [99mTc anti-carcinoembryonic antigen in colorectal cancer]. *Ugeskr Laeger* 156:1641-1645.
- Galbraith DW, Lambert GM, Grebenok RJ, and Sheen J (1995) Flow cytometric analysis of transgene expression in higher plants: green-fluorescent protein. *Methods Cell Biol* 50:3-14:3-14.
- Galiana E, Borde I, Marin P, Rassoulzadegan M, Cuzin F, Gros F, Rouget P, and Evrard C (1990) Establishment of permanent astroglial cell lines, able to differentiate in vitro, from transgenic mice carrying the polyoma virus large T gene: an alternative approach to brain cell immortalization. *J Neurosci Res* 26:269-277.
- Gaye P, Gautron JP, Mercier JC, and Haze G (1977) Amino terminal sequences of the precursors of ovine caseins. *Biochem Biophys Res Commun* 79:903-911.
- Geissler EN, Cheng SV, Gusella JF, and Housman DE (1988) Genetic analysis of the dominant white-spotting (W) region on mouse chromosome 5: identification of cloned DNA markers near W. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9635-9639.
- Gellin J, Echard G, Yerle M, Dalens M, Chevalet C, and Gillois M (1985) Localization of the alpha and beta casein genes to the q24 region of chromosome 12 in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.) by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 39:220-223.
- Goodman RG, Schanbacher F (1991): Bovine lactoferrin mRNA: sequence, analysis, and expression in the mammary gland. *Biochem Biophys Res Commun* 180:75-84
- Gordon K, Lee E, Vitale JA, Smith AE, Westphal H, Henninghausen L (1987) Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mice. *Bio/Technology* 5:1183-1187
- Gorska AE, Joseph H, Derynck R, Moses HL, and Serra R (1998) Dominant-negative interference of the transforming growth factor beta type II receptor in mammary gland epithelium results in alveolar hyperplasia and differentiation in virgin mice. *Cell Growth Differ* 9:229-238.
- Groner B and Gouilleux F (1995) Prolactin-mediated gene activation in mammary epithelial cells. *Curr Opin Genet Dev* 5:587-594.
- Grosclaude F, Garnier J, Ribandeau-Dumas B, Jeunet R (1964) Etroite dépendance des loci contrôlant le polymorphisme des caséines α S et β . *C R Acad Sci* 259:1569-1577
- Grosclaude F, Mahe MF, and Ribadeau-Dumas B (1973) [Primary structure of alpha casein and of bovine beta casein. Correction]. *Eur J Biochem* 40:323-324.
- Grosveld F, Van Assenedlft GB, Greaves DR, Kollias G 1987 Position-independent, high level expression of the human β -globin gene in transgenic mice. *Cell* 51:975-985
- Grusby MJ, Mitchell SC, Nabavi N, and Glimcher LH (1990) Casein expression in cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6897-6901.
- Günzburg WH, Salomons B, Zimmerman B, Muller M, Erfle V, Brem G (1991): A mammary-specific promoter directs expression of growth hormone not only to the mammary gland, but also to Bergman glia cells in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 5:123-133
- Gupta P, D'Eustachio P, Ruddle FH, Rosen JM (1982) Localization of the casein gene family to a single mouse chromosome. *J Cell Biol* 93:199-204

- Guthrie HD, Pursel VG, and Wall RJ (1997) Porcine follicle-stimulating hormone treatment of gilts during an altrenogest-synchronized follicular phase: effects on follicle growth, hormone secretion, ovulation, and fertilization. *J Anim Sci* 75:3246-3254.
- Guthrie HD, Pursel VG, Bolt DJ, and Cooper BS (1993) Expression of a bovine growth hormone transgene inhibits pregnant mare's serum gonadotropin-induced follicle maturation in prepuberal gilts. *J Anim Sci* 71:3409-3413.
- Gutierrez A, Meade HM, DiTullio P, Pollock D, Harvey M, Jimenez-Flores R, Anderson GB, Murray JD, and Medrano JF (1996) Expression of a bovine kappa-CN cDNA in the mammary gland of transgenic mice utilizing a genomic milk protein gene as an expression cassette. *Transgenic Res* 5:271-279.
- Haas J, Park EC, and Seed B (1996) Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol* 6:315-324.
- Hamernik DL, Keri RA, Clay CM, Clay JN, Sherman GB, Sawyer HR, Nett TM, Nilson J (1992) Gonadotrope- and thyrotrope-specific expression of the human and bovine glycoprotein hormone alpha-subunit genes is regulated by distinct cis-acting elements. *Mol Endocrinol* 6:1745-1755.
- Hammang JP, Baetge EE, Behringer RR, Brinster RL, Palmiter RD, and Messing A (1990) Immortalized retinal neurons derived from SV40 T-antigen-induced tumors in transgenic mice. *Neuron* 4:775-782.
- Hansson L, Edlund M, Edlund A, Johansson T, Marklund SL, Fromm S, Stromqvist M, and Tornell J (1994) Expression and characterization of biologically active human extracellular superoxide dismutase in milk of transgenic mice. *J Biol Chem* 269:5358-5363.
- Hayes HC and Petit EJ (1993) Mapping of the beta-lactoglobulin gene and of an immunoglobulin M heavy chain-like sequence to homoeologous cattle, sheep, and goat chromosomes. *Mamm Genome* 4:207-210.
- Hayssen, V y Blackburn, DG (1985) *Evolution* 39:1147-1149
- Heim R, Prasher DC, and Tsien RY (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12501-12504.
- Hennighausen L and Robinson GW (1998) Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes Dev* 12:449-455.
- Hnasko R, Khurana S, Shackelford N, Steinmetz R, Low MJ, Ben-Jonathan N (1997) Two distinct pituitary cell lines from mouse intermediate lobe tumors: a cell that produces prolactin-regulating factor and a melanotroph. *Endocrinology* 138:5589-5596.
- Hobbs AA, Richards DA, Kessler DJ, Rosen J (1982) Complex hormonal regulation of casein gene expression. *J Biol Chem* 257:3598-3605
- Hogan B, Beddington R, Constantini F, Lacy Elizabeth (1994) *In manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview, NY.
- Humphreys RC, Krajewska M, Krnacik S, Jaeger R, Weiher H, Krajewski S, Reed JC, and Rosen JM (1996) Apoptosis in the terminal endbud of the murine mammary gland: a mechanism of ductal morphogenesis. *Development* 122:4013-4022.
- Hurwitz DR, Nathan M, Barash I, Ilan N, and Shani M (1994) Specific combinations of human serum albumin introns direct high level expression of albumin in transfected COS cells and in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res* 3:365-375.

- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88:131-141.
- Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Thierfelder WE, Kreider B, and Silvennoinen O (1994) Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci* 19:222-227.
- Imam-Ghali M, Saidi-Mehtar N, and Guerin G (1992) Sheep gene mapping: synteny between COL2A1 and the LDHB-PEPB-TPI-GAPD- LALBA-IGF1 group. *Anim Genet* 23:529-532.
- Inouye S and Tsuji FI (1994) Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 341:277-280.
- Japon MA, Rubinstein M, and Low MJ (1994) In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* 42:1117-1125.
- Japón MA, Rubinstein M, Low MJ (1994) In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* 42:1117-1125.
- Jat PS and Sharp PA (1986) Large T antigens of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J Virol* 59:746-750.
- Jin WD, Boutillier AL, Roberts JL (1994) Characterization of a corticotropin-releasing hormone-responsive element in the rat proopiomelanocortin gene promoter and molecular cloning of its binding protein *Mol Endocrinol* 8:1377-1388.
- Jolles J, Fiat AM, Schoentgen F, Alais C, and Jolles P (1974) The amino acid sequence of sheep kappa A-casein. II. Sequence studies concerning the kappa A-caseinoglycopeptide and establishment of the complete primary structure of the protein. *Biochim Biophys Acta* 365:335-343.
- Jones WK, Yu-Lee LY, Clift SM, Brown TL, and Rosen JM (1985) The rat casein multigene family. Fine structure and evolution of the beta-casein gene. *J Biol Chem* 260:7042-7050.
- Jost B, Vilotte JL, Duluc I, Rodeau JL, and Freund JN (1999) Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland [see comments]. *Nat Biotechnol* 17:160-164.
- Kitamura Y, Michikawa M, Tanigawa T, Katsumoto T, Morita T, Nanba E, Ohama E, and Terada T (1997) Establishment and characteristics of a practical and useful astrocyte cell line transformed by a temperature-sensitive mutant of simian virus *Brain Res* 759:295-300.
- Korach KS (1994) Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* 266:1524-1527.
- Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, van der Schans A, van den Broek S, Kooiman P, Kootwijk E, Platenburg G, Pieper F, and Strijker R (1991) Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. *Biotechnology (N Y)* 9:844-847.
- Kuhn, NJ (1983) *Biochemistry of Lactation*, (Metham TB, ed), pp 159-176. Elsevier, New York, NY.
- L, Giglioni B, Ricciardi-Castagnoli P, Ottolenghi S (1994) Immortalization of multipotent growth-factor dependent hemopoietic progenitors from mice transgenic for GATA-1 driven SV40 tsA58 gene. *EMBO J* 13:4577-4586
- Laemmli U (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctot C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J (1996) Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev* 10:1284-1295.

Lee EYH, Lee WH, Kaetzel CS, Parry G, Bissell MJ (1985) Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagenous substrata: regulation of casein gene expression and secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:119-1423

Lee KF, Atiee SH, and Rosen JM (1989) Differential regulation of rat beta-casein-chloramphenicol acetyltransferase fusion gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 9:560-565.

Lee KF, DeMayo FJ, Atiee SH, and Rosen JM (1988) Tissue-specific expression of the rat beta-casein gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 16:1027-1041.

Lee YC, Asa SL, Drucker DJ (1992) Glucagon gene 5'-flanking sequences direct expression of simian virus 40 large T antigen to the intestine, producing carcinoma of the large bowel in transgenic mice. *J Biol Chem* 267:10705-10708.

Lemoine NR, Mayall ES, Jones T, Sheer D, McDermid S, Kendall-Taylor P, and Wynford-Thomas D (1989) Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection. *Br J Cancer* 60:897-903.

Li S, Crenshaw EB 3d, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG (1990) Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 347:528-533.

Liu B, Hammer GD, Rubinstein M, Mortrud M, Low MJ (1992) Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary glands of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 12:3978-3990.

Liu B, Hammer GD, Rubinstein M, Mortrud M, and Low MJ (1992) Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary glands of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 12:3978-3990.

Liu B, Hammer GD, Rubinstein M, Mortrud M, Low MJ (1992) Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary glands of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 12:3978-3990.

Liu B, Mortrud M, Low MJ (1995) DNA elements with AT-rich core sequences direct pituitary cell-specific expression of the pro-opiomelanocortin gene in transgenic mice. *Biochem J* 312:827-832.

Liu X, Robinson GW, and Hennighausen L (1996) Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation. *Mol Endocrinol* 10:1496-1506.

Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B, and Hennighausen L (1995) Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8831-8835.

Low MJ, Lechan RM, Hammer RE, Brinster RL, Habener JF, Mandel G, Goodman R (1986): Gonadotroph-specific expression of metallothionein fusion genes in pituitaries of transgenic mice. *Science* 231:1002-1004

Low MJ, Liu B, Hammer GD, Rubinstein M, and Allen RG (1993) Post-translational processing of proopiomelanocortin (POMC) in mouse pituitary melanotroph tumors induced by a POMC-simian virus 40 large T antigen transgene. *J Biol Chem* 268:24967-24975.

Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, Kozak LP, and Flier JS (1993) Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue [see comments]. *Nature* 366:740-742.

Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, and O'Malley BW (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9:2266-2278.

Maga EA, Anderson GB, Huang MC, and Murray JD (1994) Expression of human lysozyme mRNA in the mammary gland of transgenic mice. *Transgenic Res* 3:36-42.

Maschio A, Brickell PM, Kioussis D, Mellor AL, Katz D, and Craig RK (1991) Transgenic mice carrying the guinea-pig alpha-lactalbumin gene transcribe milk protein genes in their sebaceous glands during lactation. *Biochem J* 275:459-467.

Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young WS, 3d, Phillips HS, Nikolics K, and Seeburg PH (1986) A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 234:1366-1371.

McGowan R, Campbell R, Peterson A, Sapienza C (1989): Cellular mosaicism in the methylation and expression of hemizygous loci in the mouse. *Genes Dev* 3:1669-1677

McKee C, Gibson A, Dalrymple M, Emslie L, Garner I, and Cottingham I (1998) Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits. *Nat Biotechnol* 16:647-651.

McKnight RA, Spencer M, Wall RJ, Henninghausen L (1996): Severe position effects imposed on a 1 kb mouse whey acidic protein gene promoter are overcome by heterologous matrix attachment regions. *Molec Reprod Develop* 44:179-184

Meade H, Gates L, Lacy E, Lonberg N 1990 Bovine alpha S1-casein gene sequences direct high level expression of active human urokinase in mouse milk. *Bio/Technology* 8:443-446

Meier VS and Groner B (1994) The nuclear factor YY1 participates in repression of the beta-casein gene promoter in mammary epithelial cells and is counteracted by mammary gland factor during lactogenic hormone induction. *Mol Cell Biol* 14:128-137.

Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5:1-10

Menon RS, Chang YF, Jeffers KF, and Ham RG (1992) Exon skipping in human beta-casein. *Genomics* 12:13-17.

Mephram TB, Gaye P, Martin P, Mercier JC (1993) Biosynthesis of milk proteins. In *Advanced Dairy Chemistry, Vol 1, Proteins, 2nd edition* (Fox PF, ed), pp 449. Elsevier, Amsterdam.

Mercier JC (1981) Phosphorylation of caseins, present evidence for an amino acid triplet code posttranslationally recognized by specific kinases. *Biochimie* 63:1-17.

Mitchell AD, Scholz AM, Pursel VG, and Evock-Clover CM (1998) Composition analysis of pork carcasses by dual-energy x-ray absorptiometry. *J Anim Sci* 76:2104-2114.

Mixner J, Turner C (1942) Role of estrogen in the stimulation of lobule-alveolar growth by progesterone and by the mammary lobule-alveolar growth factor of the anterior pituitary. *Endocrinology* 30:591-597

- Mulchahey JJ, Regmi A, Sheriff S, Balasubramaniam A, and Kasckow JW (1999) Coordinate and divergent regulation of corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein expression in an immortalized amygdalar neuronal cell line. *Endocrinology* 140:251-259.
- Ninomiya T, Hirabayashi M, Sagara J, and Yuki A (1994) Functions of milk protein gene 5' flanking regions on human growth hormone gene. *Mol Reprod Dev* 37:276-283.
- Nishimori K, Young LJ, Guo Q, Wang Z, Insel TR, and Matzuk MM (1996) Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11699-11704.
- Paleyanda RK, Velander WH, Lee TK, Scandella DH, Gwazdauskas FC, Knight JW, Hoyer LW, Drohan WN, and Lubon H (1997) Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat Biotechnol* 15:971-975.
- Persuy MA, Legrain S, Printz C, Stinnakre MG, Lepourry L, Brignon G, and Mercier JC (1995) High-level, stage- and mammary-tissue-specific expression of a caprine kappa-casein-encoding minigene driven by a beta-casein promoter in transgenic mice. *Gene* 165:291-296.
- Persuy MA, Stinnakre MG, Printz C, Mahe MF, and Mercier JC (1992) High expression of the caprine beta-casein gene in transgenic mice. *Eur J Biochem* 205:887-893.
- Persuy MA, Stinnakre MG, Printz C, Mahe MF, Mercier JC (1992) High expression of the caprine beta-casein gene in transgenic mice. *Eur J Biochem* 205:887-893
- Pervaiz S and Brew K (1985) Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein, and protein HC. *Science* 228:335-337.
- Phi-Van L, Strätling W (1988): The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *EMBO J* 7:655-664
- Pittius CW, Hennighausen L, Lee E, Westphal H, Nicols E, Vitale J, and Gordon K (1988) A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5874-5878.
- Pittius CW, Sankaran L, Tooper YJ, Hennighausen L (1988) Comparison of the regulation of the whey acidic protein with that of a hybrid gene containing the whey acidic protein promoter in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 2:1027-1032
- Pittius CW, Sankaran L, Topper YJ, and Hennighausen L (1988) Comparison of the regulation of the whey acidic protein gene with that of a hybrid gene containing the whey acidic protein gene promoter in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 2:1027-1032.
- Platenburg GJ, Kootwijk EP, Kooiman PM, Woloshuk SL, Nuijens JH, Krimpenfort PJ, Pieper FR, de Boer HA, and Strijker R (1994) Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. *Transgenic Res* 3:99-108.
- Pollard JW and Hennighausen L (1994) Colony stimulating factor 1 is required for mammary gland development during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9312-9316.
- Poulin G, Turgeon B, Drouin J (1997) NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 1997 11:6673-6682.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, and Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233.

Prunkard D, Cottingham I, Garner I, Bruce S, Dalrymple M, Lasser G, Bishop P, and Foster D (1996) High-level expression of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic mice. *Nat Biotechnol* 14:867-871.

Pursel VG and Rexroad CE, Jr. (1993) Recent progress in the transgenic modification of swine and sheep. *Mol Reprod Dev* 36:251-254.

Pursel VG and Rexroad CE, Jr. (1993) Status of research with transgenic farm animals. *J Anim Sci* 71 Suppl 3:10-9:10-19.

Pursel VG, Wall RJ, Solomon MB, Bolt DJ, Murray JE, and Ward KA (1997) Transfer of an ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion gene into swine. *J Anim Sci* 75:2208-2214.

Raught B, Liao WS, and Rosen JM (1995) Developmentally and hormonally regulated CCAAT/enhancer-binding protein isoforms influence beta-casein gene expression. *Mol Endocrinol* 9:1223-1232.

Riegel AT, Lu Y, Remenick J, Wolford RG, Berard DS, Hager GL (1991) Proopiomelanocortin gene promoter elements required for constitutive and glucocorticoid-repressed transcription. *Mol Endocrinol* 5:1973-1982.

Riegel AT, Remenick RG, Wolford DS, Berard J, Hager GL (1990) A novel transcriptional activator (PO-B) binds between the TATA box and cap site of the pro-opiomelanocortin gene. *Nucleic Acid Research* 18:4513-4521.

Riekkinen P, Jr., Schmidt BH, and van der Staay FJ (1998) Animal models in the development of symptomatic and preventive drug therapies for Alzheimer's disease. *Ann Med* 30:566-576.

Rijnkels M, Kooiman PM, Krimpenfort PJ, de Boer HA, and Pieper FR (1995) Expression analysis of the individual bovine beta-, alpha s2- and kappa- casein genes in transgenic mice. *Biochem J* 311:929-937.

Roberts B, DiTullio P, Vitale J, Hehir K, and Gordon K (1992) Cloning of the goat beta-casein-encoding gene and expression in transgenic mice. *Gene* 121:255-262.

Roberts JL, Lundblad JR, Eberwine JH, Freneau RT, Salton SR, Blum M (1987) Hormonal regulation of POMC gene expression in pituitary. *Ann N Y Acad Sci* 512:275-285.

Robinson A (1995) Mouse models and breast cancer. *CMAJ* 153:1123-1124.

Robinson GW and Hennighausen L (1997) Inhibins and activins regulate mammary epithelial cell differentiation through mesenchymal-epithelial interactions. *Development* 124:2701-2708.

Robinson GW, Johnson PF, Hennighausen L, and Sterneck E (1998) The C/EBPbeta transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland. *Genes Dev* 12:1907-1916.

Rosen JM, Zahnow C, Kazansky A, and Raught B (1998) Composite response elements mediate hormonal and developmental regulation of milk protein gene expression. *Biochem Soc Symp* 63:101-13:101-113.

Roskelley CD, Srebrow A, and Bissell MJ (1995) A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 7:736-747.

Rubinstein M, Mogil JS, Japon M, Chan EC, Allen RG, and Low MJ (1996) Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking beta-endorphin by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3995-4000.

- Rubinstein M, Mogil JS, Japón MA, Chan EC, Allen RG, Low MJ (1996) Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking β -endorphin by targeted mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3995-4000.
- Rubinstein M, Mortrud M, Low MJ (1993) Rat and mouse proopiomelanocortin gene sequences target tissue-specific expression to the pituitary gland but not to the hypothalamus of transgenic mice. *Neuroendocrinol* 58:373-380.
- Rubinstein M, Mortrud M, Liu B, and Low MJ (1993) Rat and mouse proopiomelanocortin gene sequences target tissue-specific expression to the pituitary gland but not to the hypothalamus of transgenic mice. *Neuroendocrinology* 58:373-380.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview, NY.
- Santerre RF, Cook RA, Crisel RM, Sharp JD, Schmidt RJ, Williams DC, and Wilson CP (1981) Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4339-4343.
- Schindler C and Darnell JE, Jr. (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64:621-51:621-651.
- Schmidhauser C, Bissell MJ, Myers C, Casperson G (1990): Extracellular matrix and hormones transcriptionally regulate bovine β -casein 5' sequences in stably transfected mouse mammary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9118-9122
- Schmidhauser C, Casperson GF, Myers CA, Sanzo KT, Bolten S, and Bissell MJ (1992) A novel transcriptional enhancer is involved in the prolactin-and extracellular matrix-dependent regulation of beta-casein gene expression. *Mol Biol Cell* 3:699-709.
- Schmitt-Ney M, Doppler W, Ball RK, and Groner B (1991) Beta-casein gene promoter activity is regulated by the hormone-mediated relief of transcriptional repression and a mammary-gland-specific nuclear factor. *Mol Cell Biol* 11:3745-3755.
- Schmitt-Ney M, Happ B, Ball RK, and Groner B (1992) Developmental and environmental regulation of a mammary gland-specific nuclear factor essential for transcription of the gene encoding beta-casein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3130-3134.
- Schwartzberg DG, Nakane PK (1983) ACTH-related peptide containing neurons within the medulla oblongata of the rat. *Brain Res* 276:351-356.
- Schwartzberg DG, Nakane PK (1983) ACTH-related peptide containing neurons within the medulla oblongata of the rat. *Brain Res* 276:351-356.
- Seeley RJ, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Thiele TE, van Dijk G, Baskin DG, Schwartz MW (1997) Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature* 390:349.
- Shamay A, Pursel VG, Wall RJ, and Hennighausen L (1992) Induction of lactogenesis in transgenic virgin pigs: evidence for gene and integration site-specific hormonal regulation. *Mol Endocrinol* 6:191-197.
- Shamay A, Pursel VG, Wilkinson E, Wall RJ, and Hennighausen L (1992) Expression of the whey acidic protein in transgenic pigs impairs mammary development. *Transgenic Res* 1:124-132.
- Shani M, Barash I, Nathan M, Ricca G, Searfoss GH, Dekel I, Faerman A, Givol D, and Hurwitz DR (1992) Expression of human serum albumin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res* 1:195-208.

- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962). *J Cell Comp Physiol* 59:223-239
- Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H, Haslam SZ, Bronson RT, Elledge SJ, and Weinberg RA (1995) Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 82:621-630.
- Simonet WS, Bucay N, Pitas RE, Lauer SJ, & Taylor J (1991) Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. *J Biol Chem*, 266:8651-8654.
- Simons JP, McClenaghan M, and Clark AJ (1987) Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. *Nature* 328:530-532.
- Solomon MB, Pursel VG, Paroczay EW, and Bolt DJ (1994) Lipid composition of carcass tissue from transgenic pigs expressing a bovine growth hormone gene. *J Anim Sci* 72:1242-1246.
- Son JH, Chung JH, Huh SO, Park DH, Peng C, Rosenblum MG, Chung YI, Joh TH (1996) Immortalization of neuroendocrine pinealocytes from transgenic mice by targeted tumorigenesis using the tryptophan hydroxylase promoter. *Brain Res Mol Brain Res* 37:32-40.
- Soulier S, Vilotte JL, Stinnakre MG, and Mercier JC (1992) Expression analysis of ruminant alpha-lactalbumin in transgenic mice: developmental regulation and general location of important cis- regulatory elements. *FEBS Lett* 297:13-18.
- Spergel DJ, Kruth U, Hanley DF, Sprengel R, and Seeburg PH (1999) GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein- tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci* 19:2037-2050.
- Stricker P, Grueter R (1928) Action du lobe anterieur de l'hypophyse sur la montee laiteuse. *Copmt. Rend Soc Biol* 99:1978-1980.
- Strouboulis J, Dillon N, Grosveld F (1992): Developmental regulation of a complete 70-kb human β -globin locus in transgenic mice. *Genes & Dev* 6:1857-1864
- Subramanian A, Paleyanda RK, Lubon H, Williams BL, Gwazdauskas FC, KnightJW, Drohan WN, Velandar WH (1996) Rate limitations in posttranslational processing by the mammary gland of transgenic animals. *Ann N Y Acad Sci* 782:87-96
- Takagi Y, Talbot NC, Rexroad CE, Jr., and Pursel VG (1997) Identification of pig primordial germ cells by immunocytochemistry and lectin binding. *Mol Reprod Dev* 46:567-580.
- Talbot NC, Caperna TJ, Lebow LT, Moscioni D, Pursel VG, and Rexroad CE, JR (1996) Ultrastructure, enzymatic, and transport properties of the PICM-19 bipotent liver cell line. *Exp Cell Res* 225:22-34.
- Talbot NC, Pursel VG, Rexroad CE, Jr., Caperna TJ, Powell AM, and Stone RT (1994) Colony isolation and secondary culture of fetal porcine hepatocytes on STO feeder cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A:851-858.
- Talbot NC, Rexroad CE, Jr., Powell AM, Pursel VG, Caperna TJ, Ogg SL, and Nel ND (1994) A continuous culture of pluripotent fetal hepatocytes derived from the 8-day epiblast of the pig. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A:843-850.
- Talbot NC, Rexroad CE, Jr., Pursel VG, and Powell AM (1993) Alkaline phosphatase staining of pig and sheep epiblast cells in culture. *Mol Reprod Dev* 36:139-147.
- Talbot NC, Rexroad CE, Jr., Pursel VG, Powell AM, and Nel ND (1993) Culturing the epiblast cells of the pig blastocyst. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A:543-554.

- Talbot NC, Worku M, Paape MJ, Grier P, Rexroad CE, Jr., and Pursel VG (1996) Continuous cultures of macrophages derived from the 8-day epiblast of the pig. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32:541-549.
- Therrien M, Drouin J (1991) Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression require synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol Cell Biol* 11:3492-3503.
- Therrien M, Drouin J (1993) Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 13:2342-2353.
- Thi AD, Evrard C, and Rouget P (1998) Proliferation and differentiation properties of permanent Schwann cell lines immortalized with a temperature-sensitive oncogene. *J Exp Biol* 201:851-860.
- Threadgill DW, Womack J (1990) Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Res* 18:6935-6942
- Topper YJ and Freeman CS (1980) Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev* 60:1049-1106.
- Toscani A, Mettus RV, Coupland R, Simpkins H, Litvin J, Orth J, Hatton KS, and Reddy EP (1997) Arrest of spermatogenesis and defective breast development in mice lacking A-myb. *Nature* 386:713-717.
- van Steeg H, Klein H, Beems RB, and van Kreijl CF (1998) Use of DNA repair-deficient XPA transgenic mice in short-term carcinogenicity testing. *Toxicol Pathol* 26:742-749.
- Vanhove B, Renard JP, and Soulillou JP (1998) Genetic engineering in the pig. Gene knockout and alternative techniques. *Ann N Y Acad Sci* 862:28-36:28-36.
- Velander WH, Johnson JL, Page RL, Russell CG, Subramanian A, Wilkins TD, Gwazdauskas FC, Pittius C, and Drohan WN (1992) High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12003-12007.
- Velander WH, Lubon H, and Drohan WN (1997) Transgenic livestock as drug factories. *Sci Am* 276:70-74.
- Velander WH, Page RL, Morcol T, Russell CG, Canseco R, Young JM, Drohan WN, Gwazdauskas FC, Wilkins TD, and Johnson JL (1992) Production of biologically active human protein C in the milk of transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci* 665:391-403:391-403.
- Vilotte JL, Soulier S, Stinnakre MG, Massoud M, and Mercier JC (1989) Efficient tissue-specific expression of bovine alpha-lactalbumin in transgenic mice. *Eur J Biochem* 186:43-48.
- Vonderhaar BK (1987) Local effects of EGF, alpha-TGF, and EGF-like growth factors on lobuloalveolar development of the mouse mammary gland in vivo. *J Cell Physiol* 132:581-584.
- Vonderhaar KB, Ziska SE (1989) Hormonal regulation of milk protein gene expression. *Annu Rev Physiol* 51:641-652
- Wagner KU, Young WS, 3rd, Liu X, Ginns EI, Li M, Furth PA, and Hennighausen L (1997) Oxytocin and milk removal are required for post-partum mammary-gland development. *Genes Funct* 1:233-244.
- Wakao H, Schmitt-Ney M, and Groner B (1992) Mammary gland-specific nuclear factor is present in lactating rodent and bovine mammary tissue and composed of a single polypeptide of 89 kDa. *J Biol Chem* 267:16365-16370.

- Wall RJ, Pursel VG, Shamay A, McKnight RA, Pittius CW, and Hennighausen L (1991) High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1696-1700.
- Walther N, Einspanier A, and Jansen M (1999) Expression of granulosa cell-specific genes and induction of apoptosis in conditionally immortalized granulosa cell lines established from H-2Kb-tsA58 transgenic mice [In Process Citation]. *Biol Reprod* 60:1078-1086.
- Wang S and Hazelrigg T (1994) Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369:400-403.
- Watson SJ, Akil H, Richard CW 3d, Barchas JD (1978) Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. *Nature* 275:226-228.
- Watson SJ, Akil H, Richard CW 3d, Barchas JD (1978) Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. *Nature* 275:226-228.
- Welte T, Garimorth K, Philipp S, Jennewein P, Huck C, Cato AC, and Doppler W (1994) Involvement of Ets-related proteins in hormone-independent mammary cell-specific gene expression. *Eur J Biochem* 223:997-1006.
- Whitehead RH, VanEeden PE, Noble MD, Ataliotis P, and Jat PS (1993) Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from both colon and small intestine of adult H-2Kb-tsA58 transgenic mice [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jul 15;90(14):6894]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:587-591.
- Whitelaw CB, Archibald AL, Harris S, McClenaghan M, Simons JP, and Clark AJ (1991) Targeting expression to the mammary gland: intronic sequences can enhance the efficiency of gene expression in transgenic mice. *Transgenic Res* 1:3-13.
- Whyte DB, Lawson MA, Belsham DD, Eraly SA, Bond CT, Adelman JP, and Mellon PL (1995) A neuron-specific enhancer targets expression of the gonadotropin-releasing hormone gene to hypothalamic neurosecretory neurons. *Mol Endocrinol* 9:467-477.
- Williams DA, Rosenblatt MF, Beier DR, and Cone RD (1988) Generation of murine stromal cell lines supporting hematopoietic stem cell proliferation by use of recombinant retrovirus vectors encoding simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* 8:3864-3871.
- Wright G, Carver A, Cottom D, Reeves D, Scott A, Simons P, Wilmut I, Garner I, Colman A 1991 High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technology* 9:830-834
- Yang TT, Cheng L, and Kain SR (1996) Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* 24:4592-4593.
- Yoshida M, Cran DG, and Pursel VG (1993) Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Mol Reprod Dev* 36:462-468.
- Yoshida M, Ishigaki K, and Pursel VG (1992) Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 31:68-71.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, and Pursel VG (1993) Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod* 49:89-94.

Young JI, Otero V, Cerdan MG, Falzone TL, Chan EC, Low MJ, and Rubinstein M (1998) Authentic cell-specific and developmentally regulated expression of pro-opiomelanocortin genomic fragments in hypothalamic and hindbrain neurons of transgenic mice. *J Neurosci* 18:6631-6640.

Young JI, Otero V, Cerdán MG, Falzone TL, Cheng Chan E, Low MJ, Rubinstein M (1998) Authentic Cell-Specific and Developmentally Regulated Expression of Pro-Opiomelanocortin Genomic Fragments in Hypothalamic and Hindbrain Neurons of Transgenic Mice. *J Neurosci* 18:6631-6640.

Young WS, 3rd, Shepard E, Amico J, Hennighausen L, Wagner KU, LaMarca ME, McKinney C, and Ginns EI (1996) Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. *J Neuroendocrinol* 8:847-853.

Yu SH, Deen KC, Lee E, Hennighausen L, Sweet RW, Rosenberg M, and Westphal H (1989) Functional human CD4 protein produced in milk of transgenic mice. *Mol Biol Med* 6:255-261.

Zack DJ, Bennet J, Wang Y, Davenport C, Klaunberg B, Gearhart J, Nathans (1991): Unusual topography of bovine rhodopsin promoter-lacZ fusion gene expression in transgenic mouse retinas. *Neuron* 6:187-199

Zamierowski MM and Ebner KE (1980) A radioimmunoassay for mouse alpha-lactalbumin. *J Immunol Methods* 36:211-220.