



**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas
y Naturales**



***Identificación y estudio de las secuencias
regulatorias que controlan la expresión del gen de
proopiomelanocortina (POMC) en el sistema
nervioso central.***

***Análisis de expresión en ratones transgénicos y
footprinting filogenético.***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Biología.

Andrea Mariana Santangelo

Director de Tesis y Consejero de estudios:

Dr Marcelo Rubinstein

**Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI) UBA-
CONICET**



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Abril 2006.



La Familia, Fernando Botero.

Identificación y estudio de las secuencias regulatorias que controlan la expresión del gen de proopiomelanocortina (POMC) en el sistema nervioso central.

Análisis de expresión en ratones transgénicos y footprinting filogenético.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Marcelo Rubinstein por acompañarme en el desarrollo de mi tesis y asistir a mi formación como científica, no solo en lo profesional sino también en lo personal.

A mis compañeros y amigos de trabajo, especialmente a Flavio quien me entrenó en lo experimental y promovió el desarrollo intelectual en el grupo a través de la organización de seminarios. A Viviana que siempre estuvo literalmente al lado mío siempre que la necesité, dispuesta a darme una mano. Por su contención, apoyo y estímulo de cada día. A Marcela, Daniela y Sergio por compartir el día a día, por su apoyo y compañerismo. A Beatriz por su invaluable labor de cuidar a los ratones con amor y dedicación. A Diego Levi, por ayudarme sin objeciones en todo lo que necesite en esta última etapa de la carrera. A los que ya se doctoraron, Tomás, Elena y Diego Gelman, que también me brindaron su amistad, compañerismo y apoyo en todo momento y generaron un ambiente de trabajo divertido y distendido, tan necesario en las largas jornadas laborales.

A todo el personal del INGEBI, especialmente a Marta, por su calidez, su paciencia, su alegría y sobre todo su amistad. A Leonor, Gladis y Mari siempre muy amables y afectuosas con nosotros. A Alicia, Irma y Maria de los Ángeles, Norberto y Martín, por su apoyo y amistad. A Mario y a José por su simpatía y afecto.

A mi hermana Verónica y a todos mis amigos y familiares que me apoyaron, comprendieron y acompañaron en esta carrera tan comprometida con mucha paciencia y amor.

A mi novio Daniel, por su contención y apoyo, paciencia, confianza y amor incondicionales. Por enseñarme a creer en mí.

DEDICATORIAS

A mis padres, por su apoyo incondicional para que pudiera dedicarme exclusivamente a la profesión que elegí con tanta vocación desde muy chica: ser Bióloga.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN EN CASTELLANO.....	3
RESUMEN EN INGLES.....	4
INTRODUCCION.....	5
-Descubrimiento de la Proopiomelanocortina (POMC).....	6
-Expresión del gen de <i>POMC</i>	7
-Procesamiento de la prohormona POMC.....	10
-Funciones biológicas de los péptidos derivados de POMC.....	11
-Importancia de la expresión de <i>POMC</i> en el hipotálamo	
Rol del hipotálamo.....	13
Balance energético y obesidad.....	14
Leptina.....	16
La vía central de melanocortinas y la regulación de la ingesta.....	17
-El gen de <i>POMC</i> y obesidad en humanos.....	20
-Regulación de la expresión génica.....	24
-Regulación de la expresión del gen de POMC	
Pituitaria: elementos en <i>cis</i>	26
Pituitaria: elementos en <i>trans</i>	27
Expresión de <i>POMC</i> en el SNC: elementos en <i>cis</i>	28
-Secuencias regulatorias de la transcripción en la Era Genómica.....	31
Comparación entre secuencias genómicas de humano y ratón.....	33
Herramientas computacionales para la comparación de secuencias genómicas.....	35
Búsqueda de motivos de unión a factores de transcripción dentro de regiones de ADN conservadas.....	37
OBJETIVOS.....	40
RESULTADOS Y DISCUSION	
-La región localizada entre -13 y -9 kb del gen de <i>POMC</i> de ratón dirige la expresión de transgenes a neuronas del hipotálamo.....	41

-La región neuroespecífica de <i>POMC</i> contiene dos secuencias altamente conservadas entre el humano y el ratón.....	48
-nPE1 y nPE2 son necesarios para dirigir la expresión de transgenes a las neuronas de POMC en el arcuato.....	49
-Conservación funcional del <i>enhancer</i> neuronal de <i>POMC</i> humano en ratones transgénicos.....	55
-nPE1 y nPE2 están conservados en mamíferos pero no en otros vertebrados.....	57
-Elementos regulatorios de nPE1 y nPE2.....	59
-Conservación del <i>enhancer</i> nPE2 en mamíferos.....	62
-Diseción funcional del <i>enhancer</i> nPE2	
Expresión durante el desarrollo embrionario.....	64
Estrategia utilizada para el análisis delecional de nPE2.....	67
Las regiones 5' y central de nPE2 son necesarias para la expresión de transgenes en neuronas de POMC del núcleo arcuato.....	70
Rol de las distintas regiones de nPE2 durante el desarrollo embrionario.....	74
Potenciales TFBS dentro del <i>enhancer</i> nPE2.....	75
TABLAS COMPLEMENTARIAS.....	79
CONCLUSIONES.....	82
-Identificación de dos <i>enhancers</i> neuronales que controlan la expresión del gen de <i>POMC</i> en el SNC.....	83
-Arquitectura modular del gen de <i>POMC</i>	85
- <i>Footprinting</i> filogenético para identificar los <i>enhancers</i> neuronales de <i>POMC</i>	87
-Rol de los nPEs en el desarrollo embrionario.....	88
-Análisis delecional de nPE2.....	90
-TFBS en nPE1 y nPE2.....	91
MATERIALES Y METODOS.....	94
-Construcción de los transgenes	

Transgenes 2, 3, 4 y 6	
Transgenes 7, 8 y 9.....	95
Transgenes 5, 10, 11 y 12	
Transgenes 13, 14 y 15	
Transgenes 16, $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$, $\Delta 4$, $\Delta 5$	96
-Preparación de los transgenes para la microinyección pronuclear.....	101
-Producción de ratones transgénicos.....	102
Animales y bioterio	
Microinyección pronuclear.....	105
Transferencia embrionaria a hembras pseudopreñadas.....	106
-Identificación de ratones transgénicos	
Extracción de ADN genómico	
-Análisis de la expresión del transgén.....	109
Inmunohistoquímica	
Inmunofluorescencia.....	110
Doble hibridación <i>in situ</i> e inmunohistoquímica.....	111
Hibridación <i>in situ</i> radioactiva de las pituitarias.....	112
Tinción con X-Gal	
Ratones adultos	
Expresión en embriones	
-Secuencias y programas.....	113
REFERENCIAS.....	114

ABREVIATURAS

- ACTH:** Hormona adrenocorticotrofina.
- AGRP:** proteína relacionada con agouti.
- Arc:** Núcleo arcuato del hipotálamo.
- β -gal:** β -galactosidasa.
- CART:** Péptido regulado por cocaína y anfetamina.
- CCK:** Colecistoquinina.
- CLIP:** Péptido del lóbulo intermedio similar a la corticotrofina.
- CRH:** Hormona liberadora de corticotrofinas.
- FT:** Factor de transcripción.
- GH:** hormona de crecimiento.
- JP:** Péptido de unión.
- LCR:** Región de control de *locus*.
- LH:** Hipotálamo lateral.
- LPH:** Hormona lipotrofina.
- MCH:** Hormona concentradora de melanina.
- MC-R:** Receptor de melanocortina.
- MSH:** Hormona estimulante de melanocitos.
- NPY:** neuropéptido Y.
- NT:** péptido N terminal.
- nt:** nucleótido/s.
- NTS:** Núcleo del tracto solitario.
- ObR:** Receptor de leptina.
- PC:** Prohormonas convertidas.
- PH:** Hipotálamo posterior.
- POMC:** Proopiomelanocortina.
- PWM:** Matriz ponderada por la posición del nucleótido.
- Pa:** Núcleo paraventricular.
- QTL:** *Locus* asociado a características cuantitativas.
- RER:** Retículo endoplásmico rugoso.
- SNC:** sistema nervioso central.

TFBS: Sitios de unión para factores de transcripción.

TH: hormona tiroidea.

TRH: Hormona liberadora de TH.

VMH: Hipotálamo ventromedial.

Identificación y estudio de las secuencias regulatorias que controlan la expresión del gen de proopiomelanocortina (POMC) en el sistema nervioso central.

Análisis de expresión en ratones transgénicos y footprinting filogenético.

La proopiomelanocortina (POMC) es una prohormona que se produce en la pituitaria y en neuronas del núcleo arcuato (Arc) del hipotálamo, donde participa en el control central de la ingesta y en la analgesia inducida por estrés. Ratones y humanos mutantes en *POMC* desarrollan obesidad temprana severa y estudios genéticos en diferentes poblaciones humanas mostraron un fuerte ligamiento entre el *locus* de *POMC* y características relacionadas con la obesidad. Para identificar las secuencias regulatorias que controlan la expresión del gen de *POMC* en el Arc, se realizó un análisis de expresión en ratones transgénicos combinado con estudios de *footprinting* filogenético. Se identificaron dos secuencias altamente conservadas entre los mamíferos en la región 5' distal de *POMC*, nPE1 y nPE2, que son necesarias y suficientes para dirigir la expresión de transgenes a neuronas de POMC en el Arc, independientemente del promotor proximal, responsable de la expresión de *POMC* en la pituitaria. La eliminación de cualquiera de estas dos regiones separadamente no afecta la correcta expresión transgénica en el Arc, mientras que la eliminación de ambas impide la expresión de transgenes en las neuronas hipotalámicas de POMC, mostrando cierta redundancia funcional. La secuencia humana ortóloga también dirige la expresión de transgenes a neuronas de POMC en el Arc, demostrando conservación funcional. nPE2 está conservado en todos los mamíferos, mientras que nPE1 está presente solamente en mamíferos placentarios. nPE2 puede dirigir la expresión de transgenes a neuronas de POMC en el Arc independientemente de nPE1 y mimetiza el patrón de expresión de *POMC* durante el desarrollo. El análisis delecional en nPE2 mostró que dos regiones de 45 pb dentro de nPE2 son esenciales para su función *enhancer* en ratones adultos y embriones. Estas dos regiones son únicas en el genoma del ratón y presentan una alta concentración de potenciales sitios de unión para factores de transcripción que están conservados. El análisis delecional y el *footprinting* filogenético permitieron acotar las regiones regulatorias que son críticas para dirigir la expresión de transgenes a neuronas de POMC en el Arc. Este trabajo provee la plataforma para la realización de futuros análisis bioquímicos que permitan encontrar los factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión neuronal del gen de *POMC*.

Palabras claves: regulación de la transcripción, *footprinting* filogenético, POMC, elementos *enhancer*, balance energético, núcleo arcuato, ratones transgénicos.

Identification and study of regulatory sequences that control proopiomelanocortin (POMC) gene expression in the central nervous system.

Deletional Analysis in transgenic mice and phylogenetic footprinting.

Proopiomelanocortin (POMC) is a prohormone produced in the pituitary and neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus (Arc). Hypothalamic POMC participates in the central control of feeding and stress-induced analgesia. Mouse and human *POMC* mutants develop severe early-onset obesity, and genome-wide genetic scans found a strong linkage between the *POMC locus* and obesity-related traits in different human populations. To identify the regulatory sequences that control *POMC* expression in the Arc a combination of deletional analysis in transgenic mice and phylogenetic footprinting was performed. Two highly conserved sequences among mammals were identified in a distal 5' region of *POMC* gene, nPE1 and nPE2, which are necessary and sufficient to drive transgene expression to the arcuate POMC neurons, independently of the proximal promoter, responsible of pituitary *POMC* expression. The absence of either region separately does not abolish correct arcuate transgene expression while the deletion of both does, showing a functional redundancy. The human orthologous region can also direct transgene expression to POMC neurons in the Arc in transgenic mice, showing functional conservation. nPE2 is conserved in all mammals while nPE1 is only present in placental mammals. nPE2 can direct transgene expression to POMC arcuate neurons independently nPE1 and mimics *POMC* embryonic expression pattern. A deletional analysis in nPE2 shows that two 45 bp-regions within nPE2 are critical for its enhancer function in adult and embryonic mice. These two regions are unique in mouse genome and have a high concentration of conserved putative transcription factor binding sites. The deletional analysis and phylogenetic footprinting performed here proved to be useful to narrow the *cis*-acting regions that are critical for transgene expression in arcuate POMC neurons. This work provides the platform to perform future biochemical analysis in order to find the transcription factors involved in central POMC transcriptional regulation.

Key words: transcriptional regulation, phylogenetic footprinting, POMC, enhancer elements, energy balance, arcuate nucleus, transgenic mice.

INTRODUCCION

El estudio de la regulación de la expresión génica en el sistema nervioso central constituye uno de los mayores desafíos de la Neurociencia desde el nacimiento de la Biología Molecular. Para entender los mecanismos moleculares que gobiernan la expresión específica de los genes que se expresan en las distintas estructuras del cerebro es necesario identificar los elementos regulatorios en *cis* en la secuencias genómicas y la compleja combinación de elementos en *trans* que interactúan con ellas de manera específica.

Tradicionalmente, la identificación de regiones regulatorias de la expresión génica se ha llevado a cabo a través de laboriosos análisis delecionales en líneas celulares transfectadas o en animales transgénicos. El avance reciente de programas bioinformáticos, el secuenciamiento del genoma de diversas especies y el acceso público a diferentes bases de datos ha facilitado estos estudios permitiendo la predicción de las posibles regiones regulatorias en la vecindad de las secuencias codificantes.

Los elementos regulatorios que dirigen la expresión específica de los genes en el sistema nervioso central constituyen piezas claves que determinan las bases moleculares de distintas funciones del cerebro y el origen de diversas enfermedades. El gen de proopiomelanocortina está involucrado en una gran variedad de funciones. Las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo que expresan este gen juegan un rol fundamental en el control del balance energético debido al potente efecto anorexígeno de la α -MSH y también en la analgesia inducida por estrés, ejercida por la β -endorfina. Defectos en la actividad de la proopiomelanocortina en el cerebro inducen hiperfagia seguida de obesidad.

Esta Tesis Doctoral presenta la identificación y caracterización de los elementos regulatorios que dirigen la expresión específica del gen de proopiomelanocortina a

las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo, a través de un análisis delecional en ratones transgénicos y estudios bioinformáticos de comparación de secuencias de distintas especies (*phylogenetic footprinting*).

Descubrimiento de la Proopiomelanocortina (POMC)

La proopiomelanocortina (POMC) figuró por primera vez entre las investigaciones científicas en los años 1977 y 1978 luego de la demostración de que una única prohormona era el polipéptido precursor de múltiples péptidos biológicamente activos derivados de un procesamiento postraduccional (Mains *et al.*, 1977; Bertagna *et al.*, 1978). La era de los precursores de hormonas polipeptídicas comenzó a fines de los '60 con el descubrimiento y caracterización de la proinsulina, precursor de la insulina (Steiner *et al.*, 1969) y las lipotrofinas (β - y γ -LPH), precursores de la hormona β -estimulante de melanocitos (β -MSH; Li *et al.*, 1965). La idea de que podría existir también un precursor para la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) surgió del trabajo de Yallow y Berson (1971) quienes encontraron una sustancia inmunorreactiva para ACTH de alto peso molecular en los extractos de un tumor humano de timo, responsable de la secreción ectópica de ACTH. Esta molécula biológicamente inactiva, liberaba ACTH bioactiva cuando era sometida a una digestión suave con tripsina.

Mayores avances se lograron con ensayos bioquímicos utilizando la línea celular AtT20. Esta línea celular, que deriva de un tumor de pituitaria de ratón inducido por radiación nuclear, produce y secreta grandes cantidades de ACTH y se transformó en una herramienta de gran valor. A través de estudios biosintéticos usando aminoácidos marcados incorporados a proteínas recientemente traducidas, combinados con corridas en geles de campo pulsado, se determinó que esta molécula de alto peso molecular era el precursor de ACTH (Mains *et al.*, 1977) y que además presentaba inmunoreactividad para la hormona lipotrofina tipo β (β -LPH) y β -endorfina (Bertagna *et al.*, 1978).

Finalmente, se logró obtener y clonar el ADNc correspondiente al ARNm

codificante para el precursor de ACTH (Nakanishi *et al.*, 1979) y por primera vez su secuencia reveló la estructura de esta molécula: ACTH ubicada en la porción media de la prohormona, flanqueada por secuencias hasta ese momento desconocidas en su extremo N-terminal y β -LPH en su extremo C-terminal (Figura 1).

Expresión del gen de *POMC*

El gen de *POMC* codifica para un precursor multipéptidico capaz de generar una variedad de productos biológicamente activos luego de un complicado procesamiento post traduccional tejido específico. El gen está localizado en el cromosoma humano 2p23. La unidad transcripcional comprende 7665 pb y contiene tres exones y dos intrones (Figura 1). El exón 1 (87 pb) sólo contiene secuencias no codificantes. El exón 2 (152 pb) codifica para el péptido señal y los primeros aminoácidos del péptido N terminal (NT). El exón 3 (833 pb) codifica para la mayor parte del mensajero que se traduce a proteína, es decir, la parte C terminal del NT, el péptido de unión (*joining peptide*; JP), ACTH y β -LPH (Chang *et al.*, 1980; Drouin y Goodman, 1980). El tamaño de la unidad transcripcional de *POMC* y la organización de exones e intrones es llamativamente similar entre el humano y el resto de los mamíferos estudiados.

POMC se expresa en altos niveles en los melanotrofos y corticotrofos de la pituitaria y en dos grupos de neuronas del sistema nervioso central (SNC), el núcleo arcuato del hipotálamo (Arc) y el núcleo del tracto solitario (NTS) del tronco encefálico (Watson *et al.*, 1978; Palkovits *et al.*, 1987; Smith y Funder, 1988). Aunque el mensajero de *POMC* ha sido detectado también en muchos otros tejidos, incluyendo la piel, linfocitos, pulmones y testículos, se desconoce aún su significancia funcional.

Los corticotrofos del lóbulo anterior de la hipófisis procesan *POMC* para producir y liberar ACTH mientras que los melanotrofos del lóbulo intermedio procesan ACTH con un corte adicional mediado por la endopeptidasa PC2 produciendo la hormona

estimulante de melanocitos (α -MSH). En la pituitaria humana *POMC* se expresa solamente en los corticotrofos debido a que el lóbulo intermedio es vestigial.

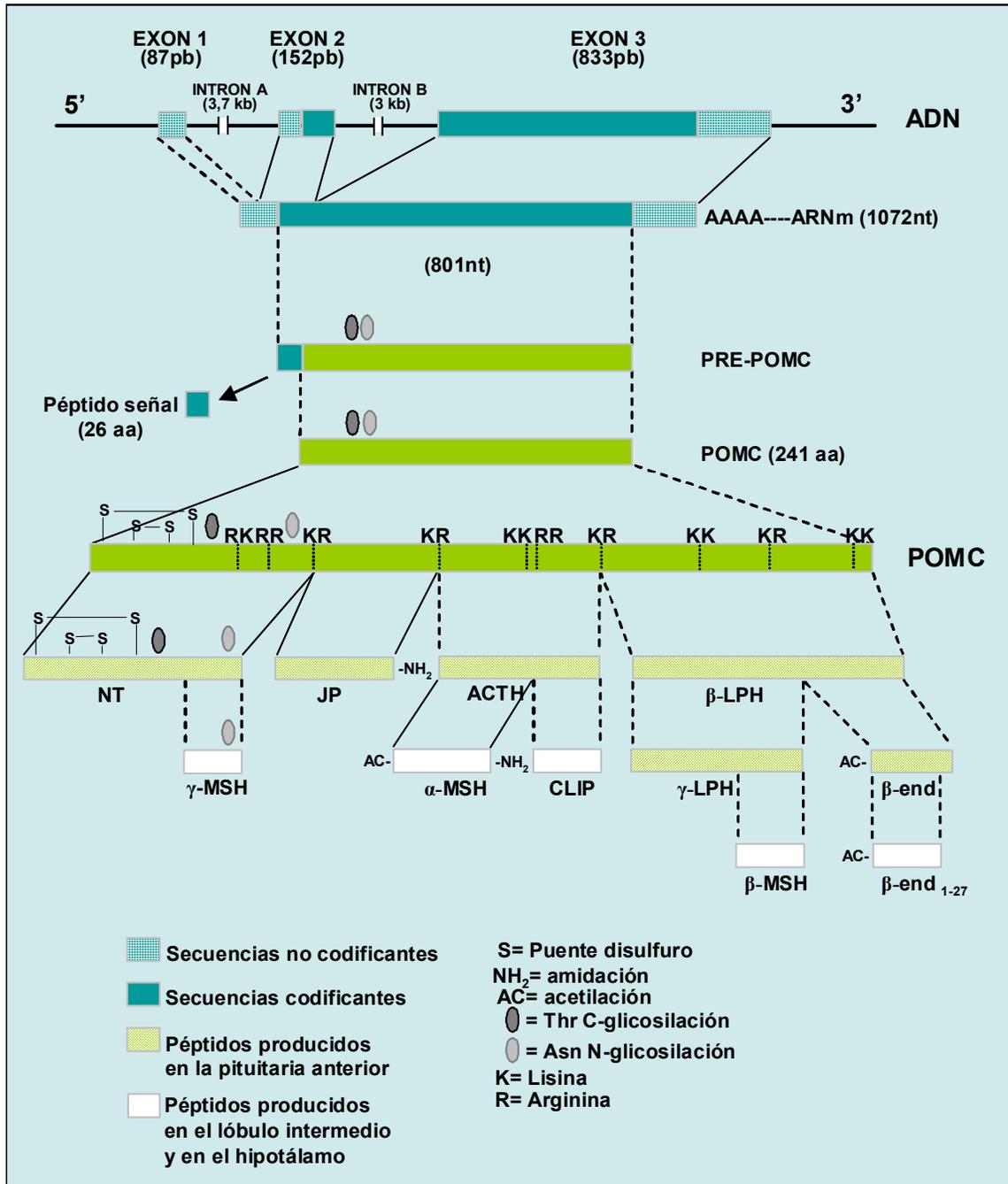


Figura 1: Esquema del gen de POMC y sus péptidos derivados (Raffin-Sanson *et al.*, 2003).

En los corticotrofos se genera un ARNm maduro de POMC de 1072 nucleótidos (nt), seguido de una cola de PolyA⁺ de ~200 nt. Los 801 nt de la región codificante

son traducidos a una molécula prePOMC que comienza con un péptido señal de 26 aminoácidos necesario para la translocación de la proteína naciente a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER). El péptido señal es rápidamente cortado. La molécula de POMC con 241 aminoácidos, formada por los péptidos NT, JP, ACTH y β -LPH sufre luego un procesamiento post-traducciona madurativo (Figura 1, para una revisión detallada ver Raffin-Sanson *et al.*, 2003).

En el cerebro neuronas en el Arc del hipotálamo y en el NTS del tronco encefálico expresan *POMC* y producen ACTH, α , β y γ -MSH y β -endorfina que desarrollan diversas funciones en la respuesta adaptativa del organismo al estrés agudo, tales como aumentar la disponibilidad de glucosa, elevar el umbral de dolor (analgesia) y postergar la generación de procesos inflamatorios (Watson *et al.*, 1978). Además, las neuronas de POMC en el Arc liberan melanocortinas que participan en el control de la alimentación y el ayuno (Fan *et al.*, 1997).

Durante el desarrollo embrionario del ratón la expresión de *POMC* muestra un patrón espacio temporal característico (Japon *et al.*, 1994). Al día 10,5 postcoitum (E10.5) ya se detecta ARNm de *POMC* en la base del diencefalo, sitio que dará origen al Arc del hipotálamo adulto. Al día E12.5 comienza a observarse ARNm de *POMC* en corticotrofos de la hipófisis ventral y al día E14.5 aparece en los melanotrofos del lóbulo intermedio dorsal. Trabajos sofisticados de Le Douarin (Couly y Le Douarin, 1985) sugieren que el hipotálamo basal y el saco de Rathke adyacente, los cuales están estrechamente enfrentados sin tejido mesodérmico intermedio, son derivados de la cresta neural antero lateral adyacente y el neuroepitelio. El camino migratorio de los dos tejidos progenitores diverge por unos pocos días y luego se encuentran nuevamente como consecuencia de la invaginación dorsal del saco de Rathke y la expresión de señales inductoras del diencefalo al saco tales como el BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*) y FGF8 (*fibroblast growth factor 8*) (Ericson *et al.*, 1998; Takuma *et al.*, 1998; Treier *et al.*, 1998). La expresión temprana de *POMC* sugiere que podría estar involucrada con

una participación en la ontogenia y diferenciación de los sistemas nervioso y endócrino relacionados con la respuesta al estrés (Elkabes *et al.*, 1989). Esta hipótesis perdió solidez luego de que los ratones mutantes deficientes en β -endorfina (Rubinstein *et al.*, 1996), en el receptor de melanocortinas *MC4-R* (Huszar *et al.*, 1997) o en el gen de *POMC* completo (Yaswen *et al.*, 1999) no mostraran ninguna anomalía durante el desarrollo embrionario.

Procesamiento de la prohormona POMC

Una vez que POMC ha alcanzado el lumen del RER sigue el tráfico intracelular de proteínas secretadas a través del Aparato de Golgi y finalmente alcanza los gránulos secretorios donde los productos finales del procesamiento son almacenados antes de ser secretados por exocitosis. Durante este tráfico la molécula de POMC sufre una serie de cortes proteolíticos y transformaciones químicas que terminan produciendo varios péptidos biológicamente activos. POMC contiene ocho pares y un cuadruplete de aminoácidos básicos los cuales son potenciales sitios de corte para el procesamiento enzimático. En cada tipo celular la naturaleza de los productos finales está dada por la presencia de diferentes endopeptidasas (Figura 2).

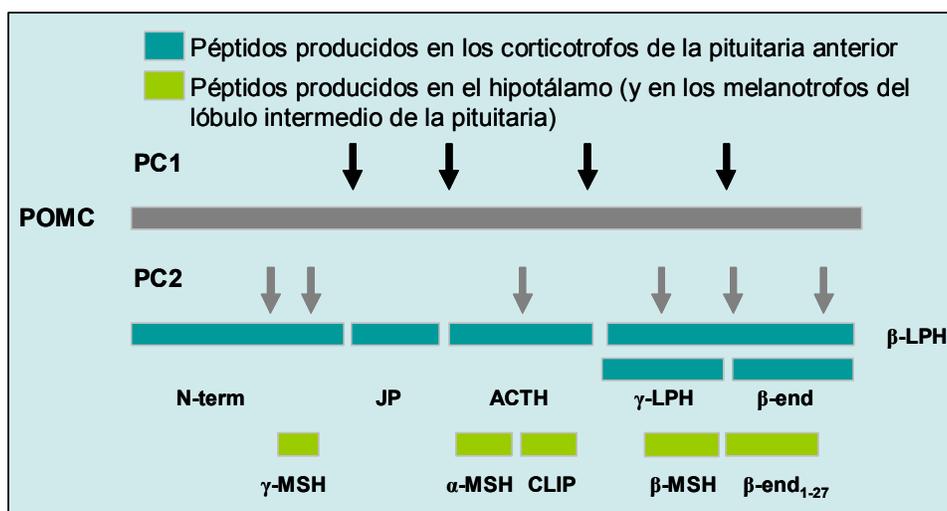


Figura 2: Esquema de procesamiento de la prohormona POMC (Raffin-Sanson *et al.*, 2003).

En los corticotrofos de la hipófisis anterior sólo cuatro de estos sitios de corte son usados, todos del tipo Lys-Arg, generando los péptidos NT, JP, ACTH, β -LPH y una pequeña cantidad de γ -LPH y β -endorfina, dado que el último sitio de corte es usado parcialmente. En los melanotropos del lóbulo intermedio de la hipófisis de roedores y en el hipotálamo y placenta en el hombre, todos los sitios de corte son usados, produciéndose péptidos más chicos: el NT da origen a γ -MSH, ACTH a α -MSH y CLIP (*corticotrophin-like intermediate lobe peptide*) y β -LPH da origen a β -MSH, β endorfina₁₋₃₁ y β endorfina₁₋₂₇.

Las enzimas que participan específicamente en la proteólisis del precursor han sido llamadas prohormonas convertasas (PCs). En los corticotrofos, sólo está presente PC1 (también llamada PC3) que tiene una acción proteolítica limitada. En todo el proceso usa 4 sitios y ACTH es el principal producto. En los melanotropos, están presentes PC1 y PC2 y su acción coordinada o sinérgica lleva a una proteólisis más pronunciada generando los fragmentos más pequeños ya mencionados. También tienen lugar otras modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, amidaciones, fosforilaciones, acetilaciones y sulfataciones, algunas de las cuales son específicas de cada célula y alteran la actividad biológica del péptido (por ejemplo, la acetilación de β -endorfina y α -MSH). Todo esto contribuye a la gran diversidad de los productos de POMC.

Funciones biológica de los péptidos derivados de POMC

Todos los péptidos producidos en los corticotrofos son derivados de la misma molécula precursora, por lo tanto, son secretados en cantidades equimolares durante el proceso de exocitosis. Sin embargo, los niveles circulantes de los péptidos no son idénticos debido a su diferente vida media. Excepto durante la preñez, todos los péptidos derivados de POMC presentes en la sangre se originan de la pituitaria anterior. Allí, POMC es estimulada por la hormona liberadora de corticotrofinas (CRH) y vasopresina, mientras que es suprimida por glucocorticoides. La PC1 es regulada de la misma manera.

ACTH completa (ACTH₍₁₋₃₉₎) es el único péptido derivado de POMC con una clara acción sobre la función adrenocortical y el único ligando conocido del receptor de melanocortinas tipo 2 (MC2-R) localizado sobre las capas corticales de la glándula adrenal. La unión de ACTH induce la producción de AMP cíclico y esteroidogénesis que resulta en la secreción de glucocorticoides, esteroides andrógenos y en menor medida, mineralocorticoides.

Los péptidos ACTH, β -LPH y γ -LPH producidos en los corticotrofos de la pituitaria humana, contiene una secuencia en común (Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly). Este heptapéptido es el responsable del efecto de estimulación de melanocitos a través de la activación de los receptores MC1-R. La activación del MC1-R en los melanocitos favorece la síntesis y dispersión de eumelanina, produciendo la coloración oscura de la piel y el pelo. En ausencia de la activación de MC1-R, se produce un pigmento rojo, la feomelanina. En los humanos, la contribución de los péptidos derivados de POMC en la pigmentación fisiológica fue demostrada por el fenotipo pelirrojo de niños deficientes en *POMC* (Krude *et al.*, 1998). Los péptidos estimulantes de melanocitos, α -MSH y β -MSH, no son producidos en la pituitaria humana. Sin embargo, se ha demostrado que existe una producción local de ACTH y α -MSH en melanocitos, queratinocitos y células endoteliales de la dermis en humanos. Se piensa que existe una función auto/paracrina que influye sobre la pigmentación de la piel.

En el síndrome de Cushing la secreción excesiva o inapropiada de ACTH se origina de tumores pituitarios. En el caso de los tumores de origen no pituitarios se llama síndrome de ACTH ectópico. En la mayoría de los adenomas de corticotrofos los productos de la transcripción del gen de *POMC* y su procesamiento son idénticos a aquellos de la pituitaria normal. En cambio, en tumores no pituitarios, es frecuente encontrar la expresión del gen de *POMC* alterada, dando como resultado varios tipos de mensajeros diferentes. Así mismo

el proceso de maduración también se encuentra alterado (De Keyzer *et al.*, 1989).

En el Arc del hipotálamo el precursor POMC es procesado por PC1 y PC2 a α -MSH y β -endorfina. La α -MSH es el principal agonista de los receptores MC3-R y MC4-R. La interrupción genética o farmacológica de la estimulación de estos receptores causa hiperfagia seguida de obesidad tanto en humanos como en roedores (Krude *et al.*, 1998; Yaswen *et al.*, 1999). La β -endorfina es un péptido opioide que estimula con alta potencia a los receptores opioides de tipo μ y con menor potencia a los receptores δ (Watson *et al.*, 1978; Civelli *et al.*, 1982; Schwartzberg y Nakane, 1983). Se produce en neuronas localizadas en el Arc y en el NTS del tronco encefálico. La β -endorfina tiene un potente efecto analgésico a través de los receptores opioides. El conocimiento de sus funciones fisiológicas específicas se evidenció a través de ratones mutantes portadores de una mutación puntual en el exón 3 del gen de *POMC* introducida mediante recombinación homóloga en células embrionarias. Esta mutación elimina la síntesis del péptido de β -endorfina preservando los otros productos de la prohormona POMC (Rubinstein *et al.*, 1993a). La mutación causa un codón de terminación prematuro en el extremo N terminal de β -endorfina. Los ratones que llevan esta mutación expresan una prohormona de POMC truncada que es procesada a ACTH y melanocortinas normalmente en la pituitaria y cerebro (Rubinstein *et al.*, 1996). La actividad basal del eje adrenal hipotálamo hipofisario es normal. Estos ratones deficientes en β -endorfina tienen respuesta de corticosterona normal a una variedad de agentes estresantes. La ausencia de β -endorfina tampoco afecta el umbral al dolor. Sin embargo, dichos ratones carecen de la respuesta analgésica producida frente a situaciones de estrés.

Importancia de la expresión de *POMC* en el hipotálamo

Rol del hipotálamo

El hipotálamo es la región del cerebro crítica para la regulación de procesos homeostáticos tales como el control del balance energético, electrolítico y térmico

entre otros (Elmqvist *et al.*, 1999). Para cumplir con estos objetivos, el hipotálamo censa señales neurales, endócrinas y metabólicas, integra estos estímulos y compromete distintas vías efectoras, que culminan en respuestas comportamentales, autonómicas y endócrinas. El rol central del hipotálamo en el apetito y la saciedad fue determinado inicialmente a través de estudios con lesiones iontoforéticas. Lesiones en el hipotálamo ventromedial (VMH) causan hiperfagia y obesidad, mientras que lesiones en el hipotálamo lateral (LH) causan anorexia y pérdida de peso (Elmqvist *et al.*, 1999). Estos resultados fueron difíciles de interpretar debido a la ausencia de vías anatómicas definidas y al desconocimiento de la identidad de los neurotransmisores y neuropéptidos involucrados. Otros estudios posteriores que utilizaron administración local de drogas, comenzaron a establecer la existencia de vías centrales capaces de modificar la ingesta de alimento, la respuesta autonómica, el metabolismo y el balance energético.

Balance energético y obesidad

El peso corporal y las reservas de energía están regulados homeostáticamente. Con la pérdida o ganancia de peso se producen cambios concertados en la ingesta y consumo de energía que resisten la perturbación inicial. La energía almacenada aumenta solamente si el ingreso de energía excede el gasto de energía corporal total. El gasto de energía puede tomar la forma de actividad física, metabolismo basal y termogénesis adaptativa. Actividad física se refiere a todos los movimientos voluntarios, mientras que metabolismo basal se refiere al gran número de procesos bioquímicos necesarios para sustentar la vida. La termogénesis adaptativa se refiere a la energía disipada en forma de calor en respuesta a cambios ambientales tales como la exposición al frío para mantener constante la temperatura corporal (Figura 3).

La composición y el peso de la masa corporal y el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos en el tejido adiposo, están determinados por la interacción entre factores genéticos, ambientales y psicosociales. Estas influencias pueden

modificar la ecuación del balance energético a largo plazo produciendo cambios estables en el peso corporal. La obesidad se define clínicamente como un estado en el cual hay un incremento del peso corporal, más específicamente tejido adiposo, en una magnitud suficiente como para producir consecuencias adversas para la salud.



Figura 3: Componentes claves del balance energético. Si la ingesta de energía (alimentación) excede crónicamente el gasto corporal total se desarrolla obesidad (Spiegelman y Flier, 2001).

El SNC influye sobre el balance energético y el peso corporal a través de tres mecanismos: 1) efectos sobre el comportamiento, que incluyen la alimentación y la actividad física; 2) efectos sobre la actividad del sistema nervioso autónomo, el cual regula el gasto de energía y otros aspectos del metabolismo; 3) efectos sobre el sistema neuroendócrino, que incluyen secreción de hormonas tales como GH, TH, cortisol, insulina y esteroides sexuales.

El comportamiento alimentario recibe la influencia de muchos factores, como la disponibilidad de alimento, factores metabólicos, neurales y endócrinos, y es modificado por estímulos visuales, olfatorios, emocionales y cognitivos. Finalmente, todos estos factores deben ser integrados de manera que resultan en la decisión de comenzar o terminar un período de alimentación (Schwartz *et al.*, 2000). La regulación del comportamiento alimentario puede ser dividida en sistemas de control a corto y largo término. El control a corto término involucra el comienzo y la culminación de las comidas. El principal determinante de la cantidad de alimento ingerido depende del inicio de respuestas saciatorias mediadas por factores neurales y endócrinos, como la liberación de colecistoquinina (CCK), que

son generados durante el curso de ingestión de la comida (Moran, 2000). Estas señales son transmitidas al tronco encefálico caudal a través del nervio vago, donde ocurre la integración con otros estímulos llevando a la terminación de la ingesta. Recientemente, se demostró que las neuronas que expresan *POMC* en el NTS del tronco encefálico se activan con la administración de CCK y que la respuesta de culminación de la alimentación inducida por CCK depende de los MC4-R centrales (Fan *et al.*, 2004; Appleyard *et al.*, 2005).

El control a largo término se produce a través de señales que reflejan el estado de las reservas de energía, tales como la hormona leptina. Esta hormona derivada del tejido adiposo, provee información al SNC para promover la homeostasis energética. Mediante el uso de ratones transgénicos que expresan *EGFP* en neuronas de POMC del Arc, producidos en nuestro laboratorio, se demostró que la leptina activa estas neuronas induciendo la liberación del neuropéptido de POMC α -MSH que es fuertemente anorexígeno (Cowley *et al.*, 2001). No es sorprendente que ambos sistemas de control estén interrelacionados (Emond *et al.*, 1999) dado que la respuesta alimentaria ante un déficit de energía esta dada predominantemente por un incremento en el tamaño de la ingesta.

Leptina

Estudios utilizando la técnica de parabiosis, en la cual los ratones son quirúrgicamente unidos para permitir el pasaje de moléculas de uno al otro, demostraron que los ratones genéticamente obesos *ob/ob* podrían ser deficientes en una señal circulatoria activadora de saciedad. Estas predicciones fueron confirmadas con el clonado del gen *ob* en 1994 que codifica para un único miembro de las familias de las citoquinas al que se llamó leptina. La leptina es sintetizada y secretada predominantemente por los adipocitos. En los ratones mutantes *ob/ob* esta proteína está truncada y es biológicamente inactiva (Zhang *et al.*, 1994). El síndrome de obesidad de los ratones *ob/ob* se corrige con la administración de leptina recombinante (Friedman and Halaas, 1998). Los niveles basales de leptina informan al hipotálamo acerca de las reservas energéticas del

organismo y en un estado nutricional normal permiten activar circuitos saciatorios. La falta de la señal de leptina ocurre rápidamente con la restricción de alimento (Ver revisión en Ahima y Flier, 2000). La reducción de leptina lleva a una compleja respuesta neural característica de la inanición que incluye hambre y búsqueda de alimento, aumento de la eficiencia metabólica y un conjunto de respuestas neuroendócrinas que favorecen la supervivencia durante períodos de escasez de energía, tales como la supresión de la reproducción, del crecimiento lineal y el descenso de los niveles de TH (Ahima *et al.*, 1996). La reincorporación de los suministros de energía rápidamente aumenta los niveles de leptina y suprime el programa de inanición. Deficiencias en la señal de leptina, aún en presencia de suficiente energía, promueven hiperfagia debido a una falsa percepción interna de inanición que continua estimulando la ingesta.

Además de su acción en el SNC, la leptina produce diversos efectos directos sobre tejidos periféricos a través de la señalización de su receptor. Uno de los efectos más importantes es la supresión de la acumulación de triglicéridos en tejidos no adiposos, tales como el músculo y el hígado (Lee *et al.*, 2001). Los receptores de leptina son miembros de la familia de receptores de citoquinas clase I que utilizan Jak quinasas asociadas para la transducción de la señal intracelular (Tartaglia, 1997). El aspecto más estudiado de la señalización de la leptina es la activación de la vía de STAT3 dependiente de Jak. El control de la señal de citoquinas involucra señales de retroalimentación negativa. SOCS-3 es un miembro de una familia de proteínas reguladoras negativas que se expresa en el Arc. El ARNm es inducido en células que responden a la leptina y sirve como un marcador de células que responden a esta hormona (Bjorbaek *et al.*, 1998, 1999b). SOCS-3 inhibe la señal de la leptina actuando a nivel de las Jak así como también a través de la unión al receptor (Bjorbaek *et al.*, 1999a).

La vía central de melanocortinas y la regulación de la ingesta

La leptina actúa a través de los receptores ObR sobre dos poblaciones distintas de neuronas en el Arc (Figura 4; revisión en Spiegelman y Flier, 2001). Una población

coexpresa los péptidos orexígenos neuropéptido Y (NPY) y proteína relacionada con agouti (AGRP) en donde la leptina es inhibitoria. La otra población coexpresa los péptidos anorexígenos CART y α -MSH y la leptina induce su expresión y liberación (Elias *et al.*, 1999; Elmquist *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2000). Entonces, la leptina reprime la acción de dos péptidos orexígenos y estimula la de dos péptidos anorexígenos a través de la acción directa sobre las neuronas del Arc.

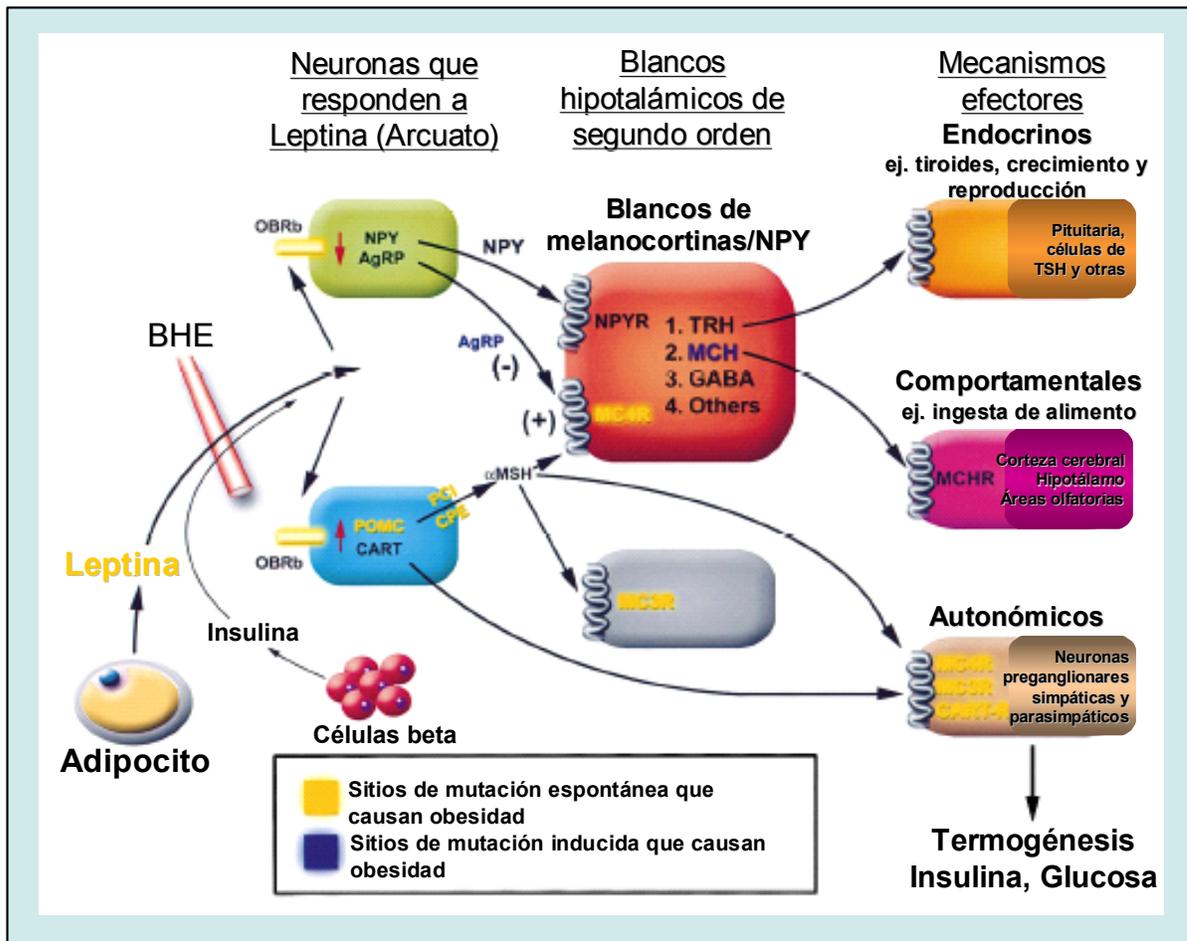


Figura 4: El circuito central de melanocortinas regulado por leptina influye sobre la homeostasis energética y el peso corporal (Spiegelman y Flier, 2001). BHE, barrera hematoencefálica.

AGRP y α -MSH son ligandos antagónicos para un mismo receptor, el MC4-R, que se expresa principalmente en el cerebro (Cone, 1999). La activación del MC4-R a través de α -MSH reduce la ingesta de alimento, mientras que la supresión de la

señal del MC4-R a través del antagonista endógeno AGRP aumenta la ingesta y disminuye la respuesta hipofágica a leptina (Fan *et al.*, 1997). La delección del gen de *MC4-R* causa obesidad severa e hiperfagia en ratones. Los heterocigotas tienen también una obesidad moderada (Huszar *et al.*, 1997). Además, se ha encontrado que entre el 4 y 5% de los humanos con obesidad severa presentan mutaciones en este *locus* y que la mayoría de los humanos afectados tienen un solo alelo mutado. El fenotipo obeso se debe a una haploinsuficiencia y no a un mecanismo dominante negativo (Farooqi *et al.*, 2000; Farooqi *et al.*, 2003).

La obesidad en varios otros síndromes raros humanos y de ratón también converge en esta vía. Por ejemplo, mutaciones en el gen de *POMC*, que impiden la síntesis de productos de *POMC* incluyendo a la α -MSH, producen obesidad en humanos y ratones (Krude *et al.*, 1998; Yaswen *et al.*, 1999). Los ratones deficientes en *POMC* (Yaswen *et al.*, 1999) tienen un fenotipo similar al de humanos (obesidad, desarrollo defectuoso de las adrenales, pigmentación alterada). Los mutantes sobreviven y ganan peso sin suplementación con glucocorticoides. Sin embargo, no hay una distribución mendeliana de los ratones deficientes en *POMC*, lo cual indica que existe una letalidad pre o perinatal con penetrancia incompleta. De la misma manera, mutaciones en las enzimas que procesan los neuropeptidos como la PC1 y la carboxipeptidasa E causa un síndrome de obesidad complejo en humanos y en ratones respectivamente, debido en parte a los efectos sobre el procesamiento de *POMC* (revisión en Barsh *et al.*, 2000).

La inactivación genómica del otro receptor central de melanocortinas, *MC3-R*, también produce obesidad en ratones (Feng *et al.*, 2000; Butler *et al.*, 2000). Resulta interesante que la obesidad ocasionada por esta delección ocurre sin la hiperfagia vista en los mutantes de *MC4-R* y podría estar asociada con un aumento de la eficiencia de incorporación de los ácidos grasos que causa la pérdida de masa corporal no grasa y un incremento del tejido adiposo. Por lo tanto, defectos en estos dos receptores de melanocortinas pueden causar

obesidad a través de mecanismos fisiológicos diferentes.

La vía central de melanocortinas regulada por leptina provee un vínculo molecular y neuroanatómico entre señales periféricas y circuitos en el SNC, pero deja abierta la pregunta acerca de cómo estas señales de melanocortinas producen efectos río abajo sobre el apetito, el gasto energético y funciones neuroendócrinas. Las neuronas del Arc que liberan melanocortinas y son reguladas por leptina, proyectan sus terminaciones nerviosas hacia neuronas de TRH del núcleo paraventricular del hipotálamo (Pa) las cuales responden a cambios en el estado nutricional y a leptina (Powis *et al.*, 1998). Las neuronas melanocortinérgicas del Arc proyectan también hacia neuronas del hipotálamo lateral (LH) que expresan el neuropéptido orexigénico MCH y orexina/hipocretina (Elias *et al.*, 1999). MCH estimula la ingesta y su expresión esta incrementada en el hipotálamo de los ratones *ob/ob*. La delección del gen de *MCH* causa anorexia y pérdida de masa corporal (Shimada *et al.*, 1998) mientras que la sobre expresión en ratones transgénicos promueve obesidad (Ludwig *et al.*, 2001). Probablemente, existan mecanismos adicionales dado que evidencias electrofisiológicas muestran que las neuronas melanocortinérgicas proyectan a interneuronas GABAérgicas en el Pa las cuales servirían como integradoras de numerosos estímulos (Cowley *et al.*, 1999). Es probable que todos estos mecanismos actúen en forma concertada.

El gen de *POMC* y obesidad en humanos

La obesidad en humanos es el resultado, en la mayoría de los casos, de factores ambientales. Sin embargo, se han encontrado varias mutaciones en genes que causan obesidad, incluyendo el de leptina, el del receptor de leptina, el de *POMC*, el de *PC1* y el de *MC4-R*. Los primeros son extremadamente raros y se transmiten de manera recesiva, mientras que defectos en el gen de *MC4-R* son más comunes (Hinney *et al.*, 1999) y son heredados de manera dominante. Dado que la prevalencia de la obesidad está aumentando en las sociedades industrializadas, parece ser que muchos de estos genes podrían conferir susceptibilidad a factores ambientales, tales como la disponibilidad de alimento y la composición de la dieta,

la respuesta al ejercicio o la falta del mismo.

Con el objetivo de identificar *loci* de susceptibilidad al desarrollo de obesidad se han llevado a cabo estudios de ligamiento genético y análisis de características cuantitativas asociadas a *loci* (QTL, *quantitative trait locus*) con fenotipos relacionados con la obesidad en varias poblaciones humanas. Un *locus* que mostró estar ligado con los niveles de leptina es el brazo corto del cromosoma 2, una región que incluye el gen de *POMC* (Comuzzi *et al.*, 1997). Este grupo realizó un análisis de ligamiento y un estudio del componente de variancia para identificar genes que influyan sobre la variación de los niveles de leptina en una población de norteamericanos de origen mexicano. El resultado reveló la existencia de un polimorfismo en el cromosoma 2 fuertemente ligado con niveles séricos altos de leptina con un *lod score* de 4,95 ($p=9 \times 10^{-7}$) y que explica un 47% de dicha variación. Este QTL presentó el *lod score* más alto publicado hasta el momento para un rastreo genómico de características cuantitativas humanas. Resultados similares fueron encontrados por otros grupos estudiando norteamericanos de origen africano (Rotimi *et al.*, 1999) y franceses caucásicos (Hager *et al.*, 1998). El gen candidato para explicar este fenotipo es *POMC* en el cromosoma humano 2p23. En un estudio posterior se utilizaron marcadores específicos de esta región y se aumentó aún más el *lod score* a 7,46 ($p=2 \times 10^{-9}$) de ligamiento entre el QTL en el cromosoma 2 y los niveles de leptina en la misma población de norteamericanos mexicanos (Hixson *et al.*, 1999). En este estudio también se encontraron nuevos polimorfismos del gen de *POMC* cuya variación estaba asociada con cambios en los niveles normales de leptina. Sin embargo, otro estudio de ligamiento similar en una población de franceses caucásicos obesos, si bien confirmó que la región alrededor del *locus* de *POMC* estaba involucrada en la variación genética de la concentración de leptina y la masa corporal, los polimorfismos y mutaciones encontradas en las regiones codificantes parecían no contribuir con este ligamiento (Delplanque *et al.*, 2000). Por otro lado, un rastreo genómico en tres grupos extremos de diferente peso corporal (obesos, delgados y con anorexia nerviosa) en una población de adolescentes alemanes no reveló

ninguna asociación entre estos grupos y distintos polimorfismos de *POMC* estudiados (Hinney *et al.*, 1998). El conjunto de todos estos experimentos indica que no se detectaron hasta hoy polimorfismos en la región codificante de *POMC* que expliquen el desarrollo de obesidad. Sin embargo, Krude *et al.* (1998) describió dos chicos no emparentados con insuficiencia congénita de la función de los corticotrofos, pelirrojos y extremadamente obesos que presentaban mutaciones bialélicas nulas en el gen de *POMC*. El fenotipo general de estos chicos ilustra la amplia variedad de funciones de *POMC*:

- 1- la falta de ACTH induce la insuficiencia en corticotrofos dado que ningún otro ligando puede estimular el MC2-R en las glándulas adrenales,
- 2- el color rojo del pelo es un efecto secundario a la falta de estimulación de los receptores MC1-R de los melanocitos: como consecuencia, se produce feomelanina (pigmento rojo) en lugar de eumelanina (pigmento marrón),
- 3- la obesidad se debe a que la falta de α -MSH, que actúa sobre los receptores centrales MC3-R y MC4-R, induce hiperfagia. Esto confirma el importante rol de las melanocortinas en la regulación de las reservas de energía en el hombre,
- 4- la falta de síntomas relacionados a la deficiencia de β -endorfina podría deberse a la redundancia de ligandos de los receptores opioides (encefalinas).

A este conjunto de características fenotípicas particulares (deficiencia en ACTH, obesidad de aparición temprana y alteraciones en la pigmentación) se lo conoce como Síndrome de deficiencia de *POMC* (Krude y Gruters, 2000). Más recientemente, el mismo grupo encontró dos chicos heterocigotas para una mutación sin sentido en la secuencia de *POMC* que irrumpe un sitio dibásico de corte entre β -MSH y β -endorfina (Challis *et al.*, 2002). El fragmento anormal (β -MSH unida a β -endorfina) se une al MC4-R humano con la misma afinidad que su ligando natural, pero no es capaz de activarlo. Esta variante cosegrega con

obesidad de aparición temprana en tres generaciones de una familia y esta ausente en personas con peso normal. Este resultado sugiere que la mutación podría conferir una susceptibilidad hereditaria a la obesidad a través de la producción de un producto de maduración aberrante que interfiere con la señalización central de melanocortinas.

Se continuaron realizando estudios para buscar mutaciones y polimorfismos en el gen de *POMC* relacionados con obesidad, encontrándose nuevas variantes incluso en regiones no codificantes pero ninguna resultó estar asociada con la masa corporal de las poblaciones de obesos estudiadas (Feng *et al.*, 2003). Otro estudio de mutaciones en los genes de *POMC* y *MC4-R* realizados en una población de suecos comparando dos grupos con pesos extremos, obesos y delgados, demostró que no había correlación entre dichas mutaciones y la masa corporal y los niveles de leptina en obesos (Suviolahti *et al.*, 2003). Solamente se encontró correlación entre variantes ya descritas previamente en el gen de *POMC* y los niveles de leptina para el grupo de los individuos delgados, resultados que discrepaban con los trabajos del grupo de Comuzzi (Hixson *et al.*, 1999).

A pesar de que se ha encontrado ligamiento entre un *locus* que contiene al gen de *POMC* y los niveles de leptina y el peso corporal en varias poblaciones, aún no se ha demostrado la existencia de alelos específicos de *POMC* asociados con la obesidad. La mayoría de los polimorfismos estudiados se encuentran en regiones codificantes o en regiones no codificantes cercanas cuya función se desconoce. Ninguna de estas variantes de *POMC* parece afectar la producción y el procesamiento de ACTH y α -MSH, dado que ninguno de los individuos incluidos en los estudios genéticos presenta insuficiencia adrenal o alteraciones de la pigmentación. Entonces, el fuerte ligamiento encontrado entre el *locus* de *POMC* y las características cuantitativas relacionadas con la obesidad podría deberse a mutaciones presentes en regiones aún no estudiadas en la vecindad del gen de *POMC* y que afecten exclusivamente la producción de melanocortinas centrales responsables del balance energético. Mutaciones aún no estudiadas podrían

encontrarse en regiones regulatorias no codificantes que participan en la expresión de *POMC* exclusivamente a nivel neuronal sin alterar la expresión del gen en la periferia. Por lo tanto, entender los mecanismos regulatorios de la expresión hipotalámica del gen de *POMC* puede resultar crucial para identificar posibles causas genéticas de predisposición a la obesidad.

Regulación de la expresión génica

La habilidad de cada célula de programar su genoma y determinar cuáles genes van a ser expresados en un dado momento y responder a estímulos específicos es central para la diferenciación de tejidos, la organogénesis y el desarrollo normal del organismo. A lo largo de la evolución de eucariotas se han perfeccionado diversos mecanismos moleculares que permiten que la expresión del genoma sea un proceso altamente regulado. Numerosos estudios demostraron que la activación de la transcripción ocurre en estadios discretos y controlados, desde el empaquetamiento de un gen en la cromatina y su localización dentro del núcleo hasta el reclutamiento de complejos multiproteicos cuya conformación y actividad resulta de interacciones específicas de proteína-proteína o proteína-ADN (Figura 5).

Un mecanismo fundamental que controla la selectividad de la expresión génica es la habilidad limitada de muchos factores de transcripción (FTs) de acceder al ADN. Los FTs regulan la expresión de un gen a través del reconocimiento y la interacción con motivos de secuencias del promotor en la región 5' o con regiones *enhancer* que pueden estar localizadas río arriba, río abajo o dentro de la misma unidad transcripcional. Los FTs pueden tener una acción positiva o negativa sobre la expresión del gen, afectando la fuerza transcripcional del complejo mayor de la RNA polimerasa II.

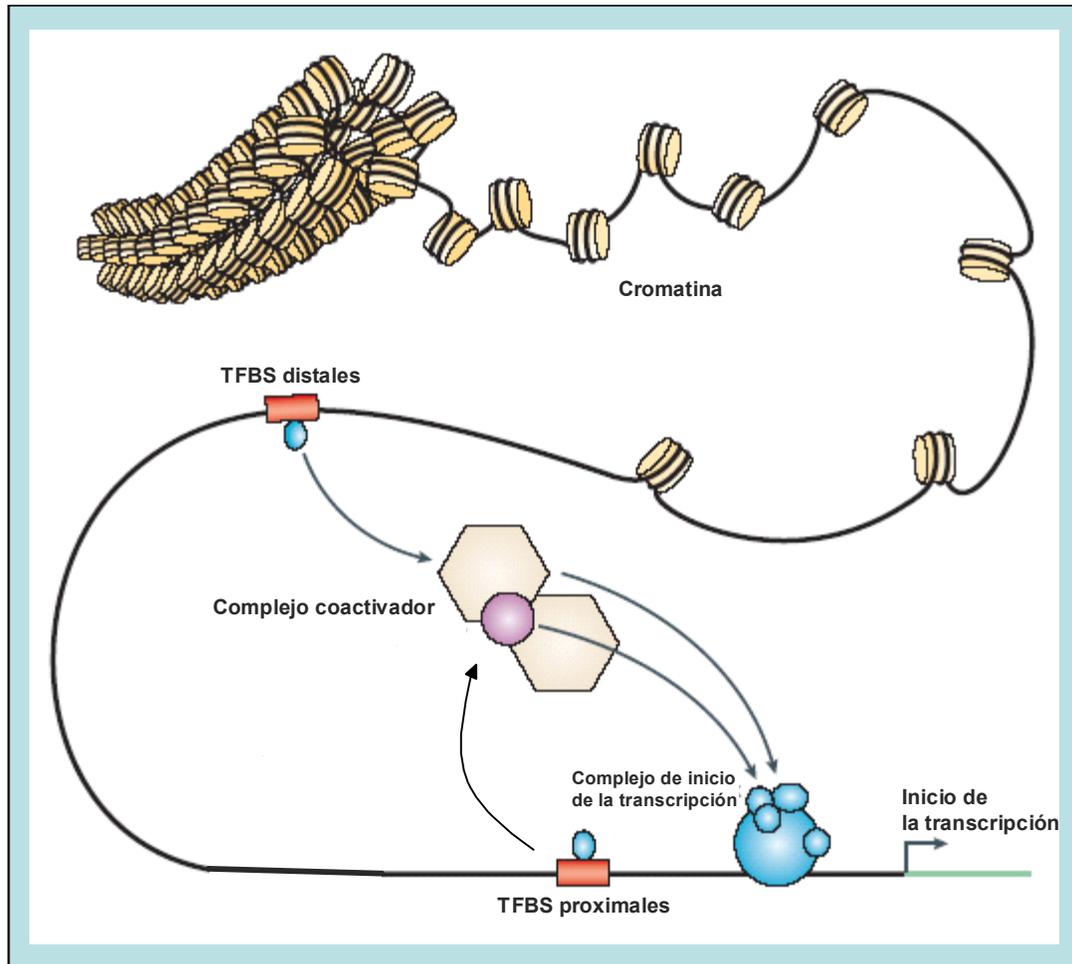


Figura 5: Componentes generales de la regulación de la transcripción. TFBS, sitios de unión para factores de transcripción (Wassewerman y Sandelin, 2004).

En estos últimos años, el concepto de FT debe también incluir no solo proteínas que tienen un dominio de unión al ADN sino también aquellas proteínas que pueden interactuar con proteínas que se unen al ADN o que modifican la cadena de ADN para indirectamente regular la transcripción. Este tipo de proteínas incluye aquellas que alteran la especificidad de la unión de FTs a la cadena molde de ADN, participan en el ensamblado del complejo de preiniciación, modifican histonas y participan en el desenrollado de la cromatina o directamente metilan o desmetilan la doble cadena de ADN (Bird y Wolffe, 1999; Jones y Wolffe, 1999).

Regulación de la expresión del gen de POMC

Pituitaria: elementos en *cis*

La línea celular inmortal corticotrófica AtT20 derivada de un tumor hipofisiario inducido por radiación, permitió importantes avances en la caracterización de los mecanismos transcripcionales del gen de *POMC* a través de la transfección de genes de fusión que incluían las secuencias del promotor de *POMC* y un gen reportero. Sin embargo, esta línea celular no permite el análisis de la expresión del gen de *POMC* en otros tipos de células que normalmente expresan *POMC*, particularmente neuronas. Para estudiar simultáneamente la capacidad de un gen reportero de ser transactivado en diferentes tipos celulares resulta conveniente la generación de ratones transgénicos. El primer informe con ratones transgénicos que expresaban la secuencia codificante de resistencia a neomicina como reportero (neo) con 770 pb del promotor de *POMC* de rata fue originado en el laboratorio de Jacques Drouin (Tremblay *et al.*, 1988). El patrón de expresión en la glándula pituitaria y la regulación por adenolectomía y dexametasona fueron consistentes con la expresión celular, aunque resultó difícil realizar una buena colocalización. El laboratorio de Malcolm Low (Hammer *et al.*, 1990) usó como reportero al gen de β -galactosidasa de *E. coli*, el cual permitió una identificación celular precisa de expresión del transgén así como también la cuantificación por ensayo enzimático con un sustrato fluorogénico. Estos estudios demostraron que la secuencia que va de -706 a +34 pb del promotor de *POMC* de rata es suficiente para dirigir la expresión de LacZ selectivamente en los corticotrofos y melanotrofos de la pituitaria. Para caracterizar los elementos mínimos requeridos del promotor de *POMC* de rata para la expresión específica del gen en la pituitaria, se realizó una serie de transgenes truncados y mutaciones seleccionadas con una variedad de reporteros diferentes (Liu *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1995). Por otro lado, se realizaron ensayos de protección a ADNasa I y retardo en geles utilizando como sonda la secuencia del promotor de *POMC* y extractos nucleares de células AtT20, cuyos resultados dieron lugar al diseño de nuevos transgenes con mutaciones específicas en el promotor de rata de *POMC*. Los resultados de estos estudios finalmente revelaron la importancia de dos sitios de unión en las

posiciones -262/-253 y -202/-193, denominados PP1 (*putative pituitary POMC1 factor*). Al menos uno de estos sitios debe estar intacto para la expresión del transgén. Por otro lado, se encontraron dos sitios de unión para el FT SP1 en las posiciones -201/-192 y -146/-136 que también participan en la expresión del transgén de *POMC* pero no resultan imprescindibles si al menos uno de los sitios PP1 está presente. Notablemente, ninguno de los transgenes se expresó selectivamente en melanotrofos o en corticotrofos, sugiriendo que ambos tipos celulares comparten uno o más sitios esenciales de unión para FT (Liu *et al.*, 1992).

Pituitaria: elementos en *trans*

Varios FTs que interactúan con el promotor de *POMC* fueron descritos. Los primeros reportados fueron llamados factores CUTE (*corticotroph upstream transcription element-binding*) que se unen a secuencias de tipo *E box*, de unión a factores *helix-loop-helix* (Therrien y Drouin, 1993). Sin embargo, estudios en animales transgénicos mostraron que el sitio CUTE no es necesario para la correcta expresión de los transgenes en la pituitaria (Liu *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1995). Más tarde fue identificado Ptx1, una homeoproteína relacionada con los genes *bicoid* y *orthodenticle* de *Drosophila melanogaster*, Otx1 y Otx2 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*. Como es expresado por todas las células del saco de Rathke (primordio de la hipófisis) y su expresión es muy temprana, los autores propusieron 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/BETA2 asociado a otros factores ubicuos del tipo *helix-loop-helix* y que actuaba sinérgicamente con Ptx1 en la expresión célula específica de *POMC* en los corticotrofos. Sin embargo, ni neuroD1/BETA2 ni Ptx1 parecen ser suficientes para la expresión específica de *POMC* en los corticotrofos y melanotrofos de la pituitaria (Szeto *et al.*, 1996). Recientemente fue identificado un

FT nuevo de la familia *Brachyury/T box* que interactúa con Ptx1 para la activación de la transcripción de *POMC* al que se llamó Tpit (*T box pituitary factor*). La expresión de Tpit está restringida a corticotrofos y melanotrofos de la pituitaria y parece ser necesaria para transactivar *POMC* en corticotrofos (Lamolet *et al.*, 2001). Más tarde, el mismo grupo mostró que Tpit es necesario, pero no suficiente para completar la diferenciación de corticotrofos. Para el comienzo de la diferenciación de corticotrofos se requiere además la expresión de NeuroD1, que a través de un mecanismo independiente, converge con Tpit a nivel de la activación de la transcripción del gen de *POMC* (Lamolet *et al.*, 2004).

Expresión de *POMC* en el SNC: elementos en *cis*

Los mecanismos que controlan la expresión de genes en el 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 con fenotipos definidos. En estudios anteriores, se analizó la expresión del gen de *POMC* a través de 7 líneas independientes de ratones transgénicos que portaban 4 kb del promotor de *POMC* de rata fusionado al gen *lacZ*. El reportero β -galactosidasa (β -gal) se expresó adecuadamente en melanotrofos y corticotrofos de la pituitaria, mientras que en el Arc del hipotálamo nunca pudo detectarse su expresión (Rubinstein *et al.*, 1993b). La falta de expresión del reportero en neuronas del Arc sugiere la existencia de algún elemento o elementos específicos para su expresión neuronal en secuencias que están fuera de las 4 kb del promotor de *POMC* de rata utilizado en ese transgén. Esto fue confirmado con la producción de 6 líneas de ratones transgénicos utilizando un clon genómico de ratón de 10,2 kb, que incluía la unidad transcripcional completa del gen de *POMC* y 2 kb flanqueantes hacia ambos extremos, marcado por la inserción de un oligonucleótido heterólogo de 30 pb dentro del tercer exón (transgén denominado HAL*). Ensayos de hibridación *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.*, 1993b). Estos datos apoyaban aún más la hipótesis de que la expresión neuronal de *POMC* requería de uno o varios

elementos distales adicionales que no eran necesarios para la expresión del transgén específicamente en células de la pituitaria. Existían en ese momento distintos ejemplos en donde *enhancers* tejido específicos dentro de un mismo gen eran 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).

Con el objetivo de encontrar dichos elementos regulatorios específicos de neuronas, nuestro laboratorio produjo ratones transgénicos con un fragmento genómico de 27 kb del gen de *POMC* de ratón. Por primera vez se logró observar expresión transgénica en el SNC, tanto en el Arc del hipotálamo como en el NTS del tronco encefálico (Young *et al.*, 1998). Esta observación se realizó en 3 líneas de ratones transgénicos independientes. En este mismo estudio se demostró que el o los elementos neuronales de *POMC* estaban localizados en regiones 5' distales del promotor. El análisis de expresión en los ratones transgénicos fue realizado mediante una estrategia de hibridaciones *in situ* combinadas (Young *et al.*, 1998), que consistía en utilizar 3 deoxiligonucleótidos específicos complementarios a distintas zonas del mensajero transgénico y el gen endógeno. El primero, dirigido al exón 2 de *POMC* detectaba tanto ARNm transgénico como no transgénico. El segundo, era complementario a un oligonucleótido heterólogo insertado en el exón 3 de los transgenes (HAL*), por lo tanto, sólo detectaba ARNm transgénico. El tercero, hibridaba con las secuencias flanqueantes al oligonucleótido insertado y de esta manera detectaba muy eficientemente ARNm del gen endógeno, y en forma muy ineficiente al ARNm transgénico. De esta manera se logró dirigir la expresión de transgenes que incluían un fragmento genómico del gen de *POMC* de ratón, a neuronas de *POMC* del Arc y del NTS (Young *et al.*, 1998). En estos experimentos se determinó que una región de 11 kb, comprendida entre -2 y -13 kb respecto del inicio de la transcripción, contenía el o los elementos responsables de la expresión neuronal de *POMC*.

Estudios posteriores lograron acotar aún más la región regulatoria neuronal del

gen de *POMC* con una resolución de 4 kb luego de dividir las 11 kb en 3 segmentos contiguos: distal (de -13 a -9 kb), medio (de -9 a -5 kb) y proximal (de -5 a -2 kb). Con el objetivo de disminuir los tiempos de trabajo y evitar la identificación de la expresión de los transgenes mediante hibridación *in situ*, se insertó una variante del gen de la proteína verde fluorescente de la medusa *Aequorea victoria* con actividad incrementada en el espectro visible y adaptada para ser traducida eficientemente en mamíferos (variante EGFP) que permite analizar la expresión del transgén en forma inmediata en cortes de criostato por visualización en microscopio de fluorescencia. El análisis de las líneas correspondientes a las construcciones -9/+8 POMC-EGFP y -5/+8 POMC-EGFP reveló expresión de EGFP en la hipófisis, mientras que no pudo detectarse en las neuronas del Arc. Estos resultados mostraron que las secuencias regulatorias neuronales estarían ubicadas en la porción distal entre -9 y -13 kb de la región 5' flanqueante, dado que para la construcción -13/+8 POMC-EGFP la expresión del reportero fue detectada tanto en hipófisis como en el núcleo arcuato con un 95% de colocalización (Cowley *et al.*, 2001).

El estudio de regiones regulatorias de la transcripción en ratones transgénicos presenta grandes ventajas. En primer lugar, la inserción de transgenes en el genoma del ratón simula con mayor exactitud el entorno transcripcional normal de los genes, de manera están regulados desde el empaquetamiento de la cromatina hasta la transcripción. Además, la regulación de la expresión del transgén está influenciada por condiciones hormonales y estímulos fisiológicos del organismo entero, la interacción con todos sus tejidos y órganos y con el medioambiente. Por otro lado, la utilización de ratones transgénicos permite estudiar el patrón de expresión temporal y espacial de genes durante el desarrollo, en varios tejidos o grupos celulares simultáneamente y en los más variados estadios fisiológicos en el adulto (Young *et al.*, 1998) a través del análisis de expresión de genes reporteros bajo la influencia de secuencias génicas regulatorias. A pesar de estas ventajas, la producción de ratones transgénicos requiere una mayor inversión económica y ciertamente mucho más tiempo especialmente determinado por los tiempos

biológicos de los ratones, los ciclos hormonales de las hembras, ciclos estacionales de apareamiento, el período de gestación de las crías, amamantamiento y genotipificación de los posibles fundadores. En el caso particular de los objetivos de este trabajo, la falta de líneas celulares neuronales que expresen *POMC* llevó a depender de la utilización de ratones transgénicos como herramienta fundamental para el estudio de las regiones regulatorias de *POMC* que dirigen su expresión al SNC.

Secuencias regulatorias de la transcripción en la Era Genómica

Las secuencias regulatorias que controlan la especificidad de la transcripción de genes constituyen sólo una pequeña fracción del 95% del genoma de mamíferos que no codifica para proteínas (<5% exones, 40-45% secuencias repetitivas, 50% secuencias no codificantes no repetitivas). Sin embargo, ellas determinan el nivel, localización y cronología de la expresión génica. A pesar de la importancia de estas secuencias no codificantes en la regulación de genes, la posibilidad de identificarlas y predecir sus funciones es extremadamente limitada. Los elementos regulatorios que actúan en *cis* pueden tener las siguientes características:

Promotor: secuencia de ADN cerca del extremo 5' de un gen que actúa como sitio de unión para la ARN polimerasa II y a partir del cual se comienza la transcripción.

Enhancer: elemento de control que eleva los niveles de transcripción de un promotor, independientemente de su orientación o distancia.

Locus Control Region (LCR): confiere expresión temporalmente regulada específica de tejido de un grupo de genes relacionados. Los LCRs funcionan independientemente de la posición, pero son dependientes del número de copias y abren la estructura del nucleosoma de manera que otros factores se puedan unir.

Aislador: secuencia de ADN que evita la activación o la inactivación de la transcripción a través del bloqueo de los efectos de la cromatina circundante.

Silenciador: elemento de control que suprime la expresión génica independientemente de su orientación o distancia.

Matrix Attachment Region (MAR): secuencia de ADN que une el andamio nuclear y puede afectar la transcripción. Estos elementos probablemente formen estructuras enrolladas de mayor orden dentro de los cromosomas e influyan sobre la expresión génica a través de la separación de los cromosomas en dominios regulatorios.

La búsqueda de secuencias regulatorias en *cis* ha involucrado varias aproximaciones experimentales: la generación de construcciones con deleciones para determinar la secuencia mínima necesaria para la transcripción de genes reporteros transfectados en células en cultivo; estudios de hipersensibilidad a la ADNasa I para identificar secuencias potencialmente disponibles para la unión de FT y estudios *in vitro* de unión ADN-proteína tales como ADN *footprinting* y retardo en geles para determinar secuencias que unan varias proteínas regulatorias. Esta búsqueda también se llevó a cabo en un número mucho más reducido de casos en ratones transgénicos de manera más lenta y extremadamente laboriosa. La reciente finalización de los Proyectos Genoma de varios organismos vertebrados permite desarrollar métodos bioinformáticos de análisis comparativo de secuencias genómicas de genes ortólogos para intentar identificar aquellas regiones que participan en la regulación génica (Ver revisión en Pennacchio y Rubin, 2001). El descubrimiento de que las secuencias que median la expresión de genes tienden a estar conservadas entre especies relacionadas incentivó los análisis comparativos de secuencias no codificantes. Las funciones potenciales de las secuencias no codificantes conservadas son numerosas e incluyen roles en el ensamblado de cromosomas y replicación del ADN así como también en la regulación génica. Se demostró que elementos regulatorios caracterizados experimentalmente están conservados entre los mamíferos. Esta evidencia es consistente con los numerosos estudios en ratones transgénicos que expresan

genes de otros mamíferos de manera tal que mimetizan su expresión en el animal de origen. Un ejemplo de esto es el gen de la apolipoproteína A (LPA), el cual evolucionó recientemente en primates y por lo tanto no se encuentra en los roedores. Cuando se introdujo un transgén genómico humano de gran tamaño (250 kb) conteniendo LPA en el genoma del ratón, su expresión específica de tejido, así como también aspectos de la respuesta de expresión a factores ambientales, mimetizó aquellas encontradas en los primates (Frazer *et al.*, 1995). Estos estudios son consistentes con la existencia de instrucciones altamente conservadas presentes en las secuencias no codificantes de los genomas de mamíferos que regulan la expresión de los genes vecinos.

La identificación de posibles regiones regulatorias se puede realizar a través de la comparación de secuencias genómicas entre especies relacionadas mediante una metodología conocida como *phylogenetic footprinting* (Wasserman y Sandelin, 2004). Se supone que las regiones regulatorias funcionales están bajo presión de selección y por lo tanto acumularán mutaciones más lentamente que las regiones adyacentes sin función específica. Es por eso que las secuencias no codificantes conservadas identificadas por diferentes métodos bioinformáticos permiten predecir la presencia de elementos regulatorios transcripcionales. Sin embargo, no es fácil determinar *a priori* cuáles especies deben ser comparadas para poder obtener la información deseada.

Comparación entre secuencias genómicas de humano y ratón

Además de que cada especie evoluciona independientemente desde su último ancestro común, regiones diferentes del genoma parecen evolucionar a tasas distintas. Algunas regiones del genoma han evolucionado rápidamente, permitiendo una fácil identificación de secuencias no codificantes conservadas entre mamíferos con una relación cercana. Otras regiones en cambio, han evolucionado lentamente y podrían requerir una comparación de secuencias entre mamíferos placentarios distantes o con otros vertebrados (por ejemplo, marsupiales, aves, reptiles o peces).

Una hipótesis implícita en la aplicación del *phylogenetic footprinting* es que la regulación de genes ortólogos estará sujeta a los mismos mecanismos regulatorios en diferentes especies. Generalmente esto es correcto cuando las distancias evolutivas son moderadas. La comparación de pares de secuencia de especies con una relación muy cercana, tales como el humano y el chimpancé, generalmente proveen poco provecho dado que las secuencias se parecen mucho una a la otra, mientras que secuencias de especies ampliamente divergentes (primates y peces) puede que no muestren ninguna similitud detectable. Por otro lado, la tasa de eventos evolutivos es diferente para genes dentro del mismo organismo. Por ejemplo, genes que son importantes tempranamente en el desarrollo embrionario pueden requerir comparaciones tan extremas como 450-500 millones de años de separación (primates-peces) para revelar regiones regulatorias. En general se trata de regiones involucradas con la estructura de la cromatina o con la regulación coordinada de grupos de genes.

El análisis del *cluster* de genes de β -globina ha actuado como modelo para definir las propiedades de elementos regulatorios no codificantes locales y distales. El LCR de β -globina fue identificado y caracterizado inicialmente a través de ensayos *in vitro* de hipersensibilidad a ADNasa I y estudios en ratones transgénicos (Talbot *et al.*, 1989). Luego de la definición experimental del LCR, la disponibilidad de la secuencia genómica de esta región reveló que el LCR estaba altamente conservado entre humano y ratón, en contraste con las secuencias no codificantes circundantes en este intervalo genómico (Jiménez *et al.*, 1992). Los elementos regulatorios no codificantes se destacan como islas de secuencias conservadas en mares de secuencia no codificante menos conservada. Estos resultados indican que, al menos en estas regiones del genoma humano, la distancia evolutiva entre el humano y el ratón, de aproximadamente 65 a 85 millones de años, es la adecuada para facilitar la identificación de elementos regulatorios. Sin embargo, algunas regiones del genoma están altamente conservadas entre humano y ratón y no es posible encontrar islas discretas de conservación en

regiones no codificantes. Otra razón por la cual el análisis comparativo de secuencia no puede ser usado en forma exclusiva para identificar elementos regulatorios es que muchos de los elementos regulatorios caracterizados experimentalmente no mostraron conservación de secuencia entre especies. Por lo tanto, aunque los estudios comparativos puedan con alta probabilidad identificar un gran número de secuencias funcionalmente importantes sobre la base del alto grado de conservación, es importante señalar que una fracción de elementos regulatorios se perderá independientemente de las especies que se estén comparando.

Herramientas computacionales para la comparación de secuencias genómicas

Al completarse recientemente la secuenciación y ensamblaje de los genomas de diversas especies de vertebrados, los estudios experimentales pueden ser diseñados a partir de estudios bioinformáticos previos que procesan la información de secuencias disponibles en bases de datos. Así, la ciencia computacional realizó contribuciones decisivas a la biología molecular mediante el desarrollo de algoritmos adecuados para detectar conservación entre secuencias genómicas. Una vez obtenidas las secuencias ortólogas adecuadas, deben ser alineadas para identificar segmentos similares. Existen dos tipos de algoritmos ampliamente usados para alinear secuencias: uno que compara segmentos cortos a lo largo de secuencias que pueden ser extensas (alineamiento local) y el otro que apunta a un alineamiento óptimo entre un par de secuencias completas con el mayor grado de similitud posible (alineamiento global). Las herramientas de alineamiento local, tales como el BLAST (Altschul *et al.*, 1990), fueron primeramente desarrolladas para identificar rápidamente similitud de secuencia entre una secuencia incógnita relativamente corta y una gran base de datos de secuencias. Para el alineamiento global, se usan algoritmos como el ClustalW2.0 (Thompson *et al.*, 1994), que genera un alineamiento simple óptimo a lo largo de toda la longitud de la secuencia de los genes ortólogos. El alineamiento local permite la detección de regiones conservadas entre distintas especies en un gran intervalo genómico. Una

vez que estas regiones son identificadas, con un alineamiento global se pueden detectar regiones menores de conservación dentro de estas regiones conservadas.

Una de las primeras herramientas bioinformáticas de alineamiento local utilizadas fue el *dot plot*, una matriz que grafica base a base la identidad entre dos secuencias cortas de ADN. Una versión mejorada para analizar secuencias más largas es el programa *Dotter* (Sonnhammer y Durbin, 1995) disponible en el sitio de Internet <http://www.cgb.ki.se/cgb/groups/sonnhammer/Dotter.html>.

Para una mejor visualización del resultado del alineamiento se han desarrollado varias herramientas que ayudan a la interpretación de estos datos. El VISTA Browser (VISTA, *visualization tool for alignment*; Mayor *et al.*, 2000; Frazer *et al.*, 2004) combina un programa de alineamiento global con una herramienta gráfica para analizar alineamientos que permiten la identificación de secuencias conservadas codificantes y no codificantes entre especies. Un programa similar, PIPMaker (Schwartz *et al.*, 2000), ha sido usado extensamente en análisis comparativos de secuencias. Luego de un alineamiento local de secuencia que usa una versión modificada del BLAST (BLASTz), se genera un gráfico (PIP, *percentage identity plot*) que permite una visualización global del alineamiento en el cual el eje horizontal corresponde a una de las secuencias y el eje vertical grafica el porcentaje de identidad con cada una de las especies comparadas. El PIP indica regiones de similitud basadas sobre el porcentaje de identidad de cada segmento del alineamiento (el número de coincidencias en la región dividido por su longitud). Estas, así como otras herramientas de visualización de secuencias recientemente desarrolladas, como el ECR Browser (Ovcharenko *et al.*, 2004) permite a los investigadores analizar datos de secuencias de dos o más especies para identificar visualmente regiones no codificantes conservadas en la vecindad de los genes de interés.

Búsqueda de motivos de unión a factores de transcripción dentro de regiones de ADN conservadas

Las técnicas basadas en la comparación de secuencias sólo permiten la identificación de secuencias no codificantes conservadas mayores a 50-100 nucleótidos probablemente compuestas por múltiples elementos regulatorios. Por lo tanto, la identificación de los sitios de unión a FTs presentes dentro de las regiones conservadas mediante procedimientos puramente bioinformáticos resulta muy difícil.

Los análisis genéticos y bioquímicos realizados en los últimos 25 años basados en la interacción ADN-proteína determinaron las secuencias nucleotídicas específicas a las que se unen diferentes los FTs. La disponibilidad de secuencias consenso permitió construir bases de datos que pueden ser examinadas por Internet para predecir potenciales sitios de unión de FTs (TFBS, *transcription factor binding sites*) en secuencias genómicas. Para poder examinar estas bases de datos se han construido modelos que describen las propiedades de unión de una secuencia a partir de la información de secuencias consenso obtenidas de los análisis experimentales. Generalmente, los FTs tienen distintas preferencias hacia secuencias específicas. A pesar de que algunos FTs se unen a secuencias de ADN altamente específicas, la mayoría depende sólo de una pequeña secuencia central invariable (*core*, aproximadamente 4-6 pb) rodeada de un número variable de nucleótidos degenerados. Por otro lado, la construcción de dichos modelos se basa en el supuesto de que cada FT se une de manera independiente a su blanco, es decir, que la unión no es influenciada por secuencias adyacentes y por la proximidad de otras proteínas. Esto es fundamentalmente incorrecto, dado que las interacciones combinadas de FTs que se unen a sitios vecinos son esenciales para la regulación específica de la transcripción de genes. La violación de este supuesto trae como consecuencia una tasa extremadamente alta de falsos positivos, es decir, los métodos detectan sitios de unión potenciales que no necesariamente tienen importancia funcional. La construcción de modelos para predecir TFBS está limitada por la escasa disponibilidad de elementos en *cis*

validados experimentalmente. Estos sitios están generalmente definidos por arduos análisis de promotores en el laboratorio que involucran mapeo delecional y mutagénesis de secuencias regulatorias. Debido a la tolerancia de los FTs de una variación significativa entre las secuencias blanco, se requieren múltiples sitios para construir un modelo. Más recientemente, se han utilizado matrices que ponderan la posición de cada nucleótido en la secuencia consenso (PWM, *position-weighted matrices*) para estimar la probabilidad de que una secuencia dada una un FT específico. En este método, se usan datos experimentales para asignar un puntaje o *score* para cada base en cada posición en el TFBS. El *score* se basa en un grupo de sitios de unión conocidos y en la frecuencia con la cual cada base es encontrada en cada posición (Stormo, 2000). En el presente, la base de datos más ampliamente usada es *TRANSFAC database* (<http://www.biobase.de>) (Wingender *et al.* 2001), la cual es continuamente actualizada con los datos experimentales disponibles y es usada por un gran número de programas de análisis de secuencia para identificar potenciales TFBS. Programas de reconocimiento de patrones tales como MATCH o MatInspector (Quandt *et al.* 1995) usan estas librerías de PWM de FT para identificar coincidencias significativas en las secuencias de ADN.

Dos observaciones complementarias de las características de las secuencias regulatorias ha motivado mejoras sustanciales en la predicción de TFBS funcionales. Primero, las secuencias de regiones regulatorias se encuentran conservadas entre las especies. Segundo, la regulación génica es mediada por la interacción cooperativa entre FTs que se unen a grupos de sitios dentro de módulos regulatorios en *cis*. El uso de alineamientos de secuencias comparativos entre múltiples especies ha demostrado disminuir la gran cantidad de falsos positivos derivados del análisis de secuencias provenientes de un único organismo (Levy *et al.*, 2001). Los sitios de unión encontrados en secuencias humanas y en la secuencia ortóloga de ratón y otros mamíferos tienen mucha más probabilidad de ser funcionales que aquellos encontrados sólo en humanos. Entre las herramientas utilizadas se encuentra el *regulatory VISTA* (rVISTA; Loots *et al.*,

2002; Loots y Ovcharenko, 2004) disponible en el sitio <http://www.dcode.org>, que usa el programa de alineamiento AVID, la base de datos *TRANSFAC* y el paquete de visualización del VISTA para detectar TFBS alineados y conservados en secuencias regulatorias de ADN. El rVISTA realiza primero un alineamiento global (AVID) entre las dos secuencias ortólogas para encontrar regiones conservadas. Luego detecta TFBS en cada secuencia individual utilizando el programa *tfSerch* para examinar la base de datos *TRANSFAC* de PWM. Identifica entonces pares de TFBS localmente alineados (BLASTz) y selecciona aquellos que se encuentran en zonas altamente conservadas del genoma. De los TFBS localmente alineados clasifica como conservados aquellos que presentan más del 80% de identidad de secuencia en una ventana de 20 pb. Finalmente, crea un gráfico que superpone TFBS individuales o en *clusters* con el perfil de conservación del *locus* genómico. A pesar de que este método minimiza el número de falsos positivos, aún aquellas secuencia que cumplen con los criterios más exigentes podrían no ser funcionales en el contexto genómico, por ejemplo, el sitio de unión podría ser inaccesible debido a la estructura de la cromatina o bloqueo por otras proteínas. En definitiva, todo sitio detectado por métodos bioinformáticos es putativo y debe ser verificado experimentalmente. Otro problema de igual importancia es el gran número de TFBS que se pierden en tales búsquedas en bases de datos (falsos negativos) debido a que sólo se conoce una fracción de los FTs y sus sitios de unión que están disponibles para la comparación, dejando un gran número de TFBS desconocidos.

El análisis de secuencias regulatorias ha sido significativamente mejorado a través del análisis de evolución de secuencias (*phylogenetic footprinting*) y la interacción combinada de FTs (análisis de *clustering*). Sin embargo, el aumento en la complejidad del análisis de secuencias regulatorias pone de manifiesto las limitaciones computacionales ante la falta de disponibilidad de datos experimentales y a la vez promete la implementación de nuevos algoritmos que permitan una predicción computacional más precisa de los mecanismos de regulación de la expresión génica.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es identificar y caracterizar las secuencias regulatorias que dirigen la expresión del gen de *POMC* al Arc y estudiar las posibles interacciones entre los mecanismos transcripcionales que operan en el SNC y los que controlan la expresión de *POMC* en células endocrinas hipofisarias. Para ello se combinaron estudios funcionales de expresión en ratones transgénicos con la utilización de programas bioinformáticos que permiten el análisis de comparación de secuencias genómicas de *POMC* de diversas especies (*phylogenetic footprinting*) para detectar posibles regiones regulatorias conservadas involucradas en la regulación de la transcripción del gen de *POMC* en el SNC.

RESULTADOS Y DISCUSION

La región localizada entre -13 y -9 kb del gen de *POMC* de ratón dirige la expresión de transgenes a neuronas del hipotálamo

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que 2 kb de la región 5' flanqueante del gen de *POMC* de ratón dirigen la expresión de transgenes a melanotrofos y corticotrofos de la hipófisis pero no al SNC (Rubinstein *et al.*, 1993). Para dirigir la expresión de transgenes específicamente a las neuronas de *POMC* en el Arc del hipotálamo son necesarias 11 kb adicionales ubicadas entre -13 y -2 kb río arriba del sitio de iniciación de la transcripción (Young *et al.*, 1998). La expresión transgénica de estos estudios se analizó mediante hibridaciones *in situ* de ARNm con un oligonucleótido antisentido radioactivo que reconoce una secuencia heteróloga de 30 pb insertada en el tercer exón. Posteriormente, para facilitar el análisis de la expresión del transgén, la región codificante de la proteína verde fluorescente EGFP fue insertada en el exón 2 del gen de *POMC* de ratón, inmediatamente antes del codón de inicio de la traducción (Figura 6, transgén 1). Este transgén de 22 kb, que contiene la unidad transcripcional completa del gen de *POMC* de ratón junto con 13 kb de la región 5' flanqueante y 2 kb de la región 3' flanqueante, dirige la expresión de *EGFP* a casi el 100% de las neuronas que expresan *POMC* en el Arc, lo cual permitió, además, la realización de estudios electrofisiológicos *in vivo* de neuronas de *POMC* (Cowley *et al.*, 2001; Heisler *et al.*, 2002). Para acotar aún más la región 5' flanqueante necesaria para la expresión de *POMC* en el cerebro se realizaron deleciones seriadas del fragmento de 11 kb (-13 a -2 kb) con una resolución de 4 kb para la producción de ratones transgénicos (Cerdán y Rubinstein, datos no publicados). Contrariamente a los ratones que llevaban el fragmento completo (transgén 1) los portadores del transgén que carecía de la región de 4 kb entre -13 y -9 kb río arriba del inicio de la transcripción (transgén 4) no lograron expresar *EGFP* en las neuronas de *POMC* en el Arc, sugiriendo la importancia de este fragmento para la expresión de *POMC* a nivel neuronal (Figura 6 y 7). Para descartar la presencia de bajos niveles de expresión de *EGFP* difíciles de visualizar por emisión de fluorescencia natural,

se analizaron cortes de cerebro a la altura del Arc por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal anti-EGFP que da una señal mucho más sensible (Figura 7).

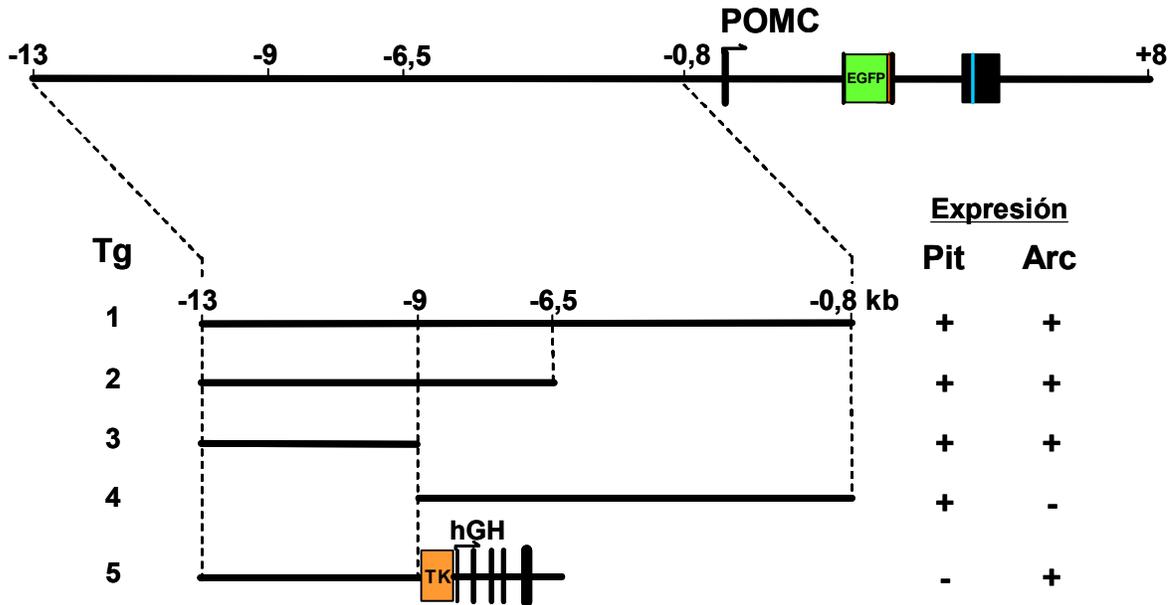


Figura 6: Esquema del transgén 1. Los transgenes de 1 a 4 llevan la unidad transcripcional completa del gen de *POMC* de ratón con la región codificante de *EGFP* insertada en el exón 2 antes del codón de inicio de la traducción. Cajas negras: exones de *POMC*; caja verde: *EGFP*; caja roja: sitio de poliadenilación; caja azul: inserto heterólogo 30-mer para genotipificación. Se muestran las delecciones realizadas entre -13 y -0,8 kb en los transgenes de 1 a 4. El transgén 5 lleva la región distal entre -13 y -9 kb del gen de *POMC* de ratón río arriba del promotor mínimo de la timidina quinasa (TK) del virus *Herpes simplex* seguido del gen reportero de hormona de crecimiento humana (hGH). La expresión positiva en corticotrofos y melanotrofos de la pituitaria (Pit) y en neuronas de *POMC* en el núcleo arcuato (Arc) del hipotálamo se indica + y su ausencia con un -.

Para estudiar la posibilidad de que exista alguna interacción entre esta región de 4 kb y otras secuencias ubicadas río abajo que estén contribuyendo a la especificidad de expresión del transgén en las neuronas del Arc, se construyeron dos nuevos transgenes eliminando las regiones entre -6,5 y -0,8 kb y entre -9 y -0,8 kb (Figura 6, transgenes 2 y 3, respectivamente). Para estudiar el patrón de expresión del gen reportero algunas secciones de cerebro cortadas en vibrátomo

de varias líneas independientes de ratones transgénicos fueron sometidas a una inmunohistoquímica usando un anticuerpo policlonal contra EGFP y reveladas con un cromógeno azul, mientras que otras secciones fueron incubadas con un anticuerpo policlonal para ACTH y reveladas con una señal de fluorescencia roja (ver detalles en Materiales y Métodos) para detectar la posible colocalización del producto endógeno de *POMC* con la fluorescencia verde transgénica de EGFP (Figura 7). El análisis de la expresión de los transgenes 2 y 3 demostró que EGFP se coexpresa con POMC en las neuronas del Arc con un grado de colocalización y un patrón de expresión similar al del transgén parental 1 sugiriendo que la región entre -9 y $-0,8$ kb no es necesaria para la expresión neuroespecífica de *POMC* en el hipotálamo (Figura 7, transgenes 1 y 3).

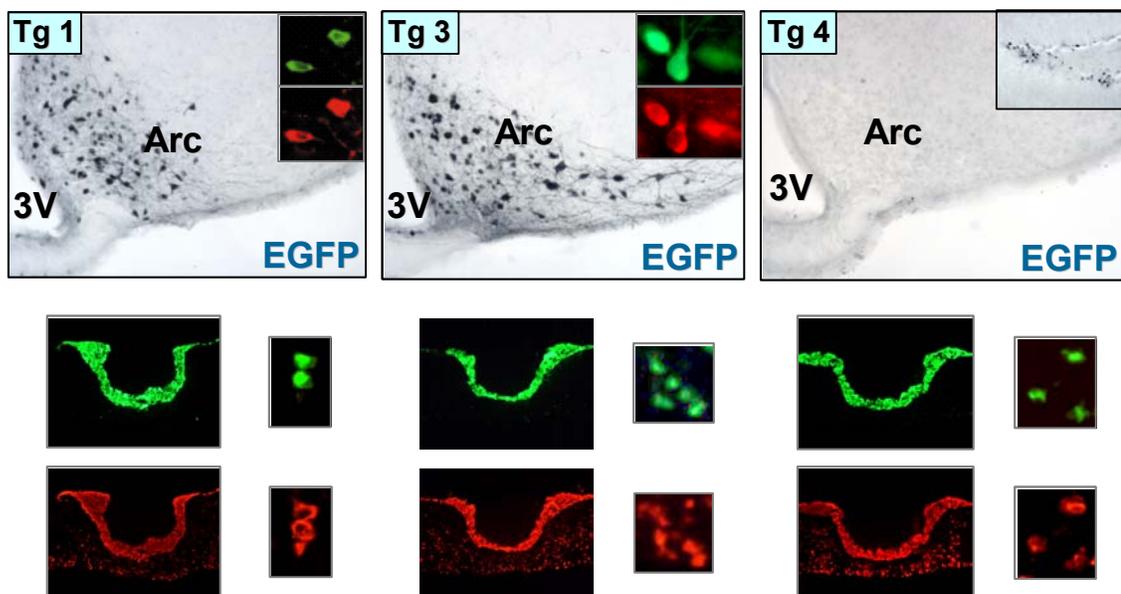


Figura 7: Expresión del gen reportero *EGFP* en el Arc y en la glándula pituitaria de ratones transgénicos. Arriba: Secciones coronales de cerebros de ratones transgénicos inmunomarcadas para EGFP. Los detalles en los Tg 1 y 3 muestran colocalización fluorescente entre EGFP (fluorescencia verde) y ACTH (inmunofluorescencia roja). El detalle en el Tg 4 muestra expresión ectópica en el giro dentado del hipocampo. Abajo: Secciones coronales de pituitarias de ratones transgénicos. Panel superior, fluorescencia de EGFP (verde). Panel inferior, inmunofluorescencia de ACTH (roja). Los detalles a la derecha muestran colocalización en corticotrofos del lóbulo anterior de la hipófisis. Arc, núcleo arcuato. 3V, tercer ventrículo.

La expresión en los corticotrofos y melanotrofos de la pituitaria tampoco se vio afectada por las delecciones (Figura 7, abajo) confirmando estudios previos que demuestran que la región promotora proximal del gen de *POMC* es capaz de dirigir la expresión de transgenes específicamente al LA y al LI de la pituitaria (Liu *et al.*, 1992). El transgén 4, incapaz de dirigir la expresión del reportero al Arc (Figura 7, arriba), se expresó adecuadamente en los corticotrofos y melanotrofos de la pituitaria (Figura 7, abajo).

Estos resultados sugieren que las 4 kb ubicadas entre -13 y -9 kb de la región 5' flanqueante del gen de *POMC* de ratón contienen uno o más *enhancers* neuronales necesarios para dirigir específicamente la expresión de *POMC* a las neuronas del Arc que son independientes de las secuencias entre -9 y -0,8 kb y de la distancia de esta región al sitio de inicio de la transcripción. Además de la expresión transgénica específica en neuronas hipotalámicas y en células hipofisarias de *POMC*, cada línea de ratones transgénicos mostró expresión ectópica propia en variadas regiones como la corteza cerebral, habénula, órgano subfornical, amígdala y áreas lateral y posterior del hipotálamo (Figura 8).

Un análisis comparativo mostró que la expresión ectópica observada se producía al azar y no dependía de ninguna secuencia *enhancer* presente en las construcciones que pudiera activar la transcripción en otra región del cerebro de manera específica sino que, probablemente, dependía del sitio de inserción del transgén dentro del genoma y de la influencia transcripcional de las secuencias vecinas.

Sin embargo, es importante destacar que los transgenes de 1 a 4 mostraron una expresión ectópica consistente de *EGFP* en la capa subgranular del giro dentado del hipocampo. Recientemente se demostró que esta expresión ectópica se debe a la presencia de *enhancers* críticos ubicados en la región entre -2 y -0,8 kb del promotor de *POMC* de ratón (Figura 8A; Overstreet *et al.*, 2004).

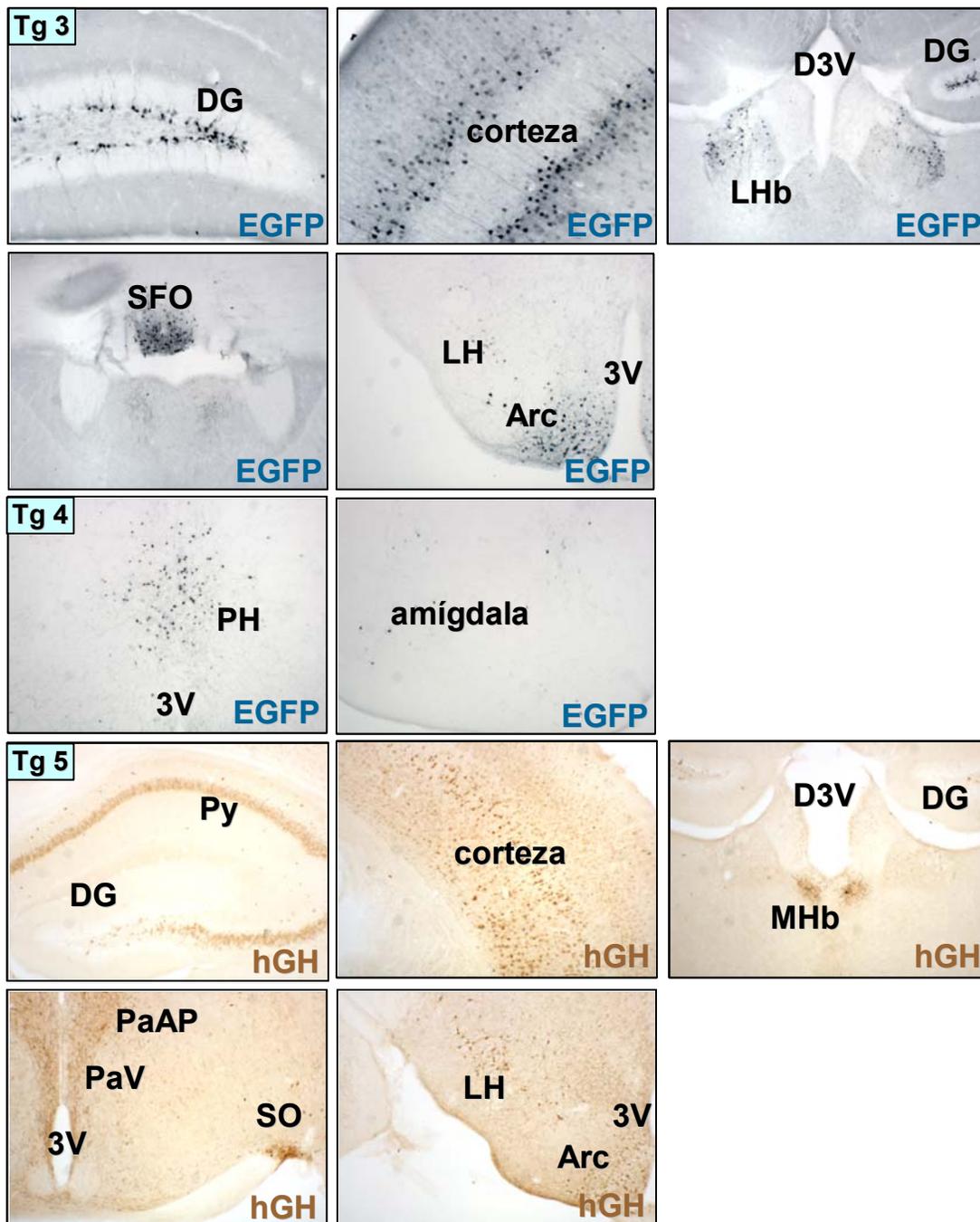


Figura 8: Expresión ectópica del reportero *EGFP* (inmunomarcación azul) en los transgenes 3 y 4 y de *hGH* (inmunomarcación marrón) en el transgén 5. DG, giro dentado del hipocampo. corteza, corteza cerebral. LHb, habénula lateral. D3V, tercer ventrículo parte dorsal. SFO, órgano subfornical. LH, hipotálamo lateral. 3V, tercer ventrículo. Arc, núcleo arcuato. PH hipotálamo posterior. Amígdala, área amigdalohipocampal. Py, capa de células piramidales del hipocampo. MHb, habénula medial. PaAP, núcleo paraventricular del hipotálamo parte anterior. PaV, núcleo paraventricular del hipotálamo parte ventral. SO, núcleo supraóptico.

El próximo objetivo fue determinar si la región de ADN de 4 kb era suficiente para dirigir la expresión de transgenes a neuronas de POMC en ausencia del promotor proximal de POMC, esencial para su expresión en los corticotrofos y melanotrofos de la pituitaria (Liu *et al.*, 1992; Rubinstein *et al.*, 1993). Construimos entonces un transgén en el cual la región de -13 a -9 kb del gen de *POMC* de ratón fue ligada río arriba de un promotor mínimo heterólogo obtenido del gen de la *timidina kinasa* (TK) del virus *Herpes simplex*, seguido del gen de la *hormona de crecimiento* humana (hGH) como reportero (Figura 6, transgén 5). Se realizó una colocalización en secciones de cerebro de ratones transgénicos por medio de una hibridación *in situ* para el mensajero endógeno de *POMC* usando una ribosonda marcada con digoxigenina (revelada con el cromógeno marrón diaminobenzidina) seguido por inmunohistoquímica contra hGH (revelada con el cromógeno azul cloruro de benzidina). El uso de diferentes genes reporteros (*EGFP*, *hGH*, *LacZ*) a lo largo de este trabajo obedece a simplificaciones de subclonado de transgenes y/o a metodologías más eficientes para la detección de colocalización simultánea de la expresión transgénica y endógena.

El fragmento de -13 a -9 kb fue capaz de dirigir la expresión del gen reportero *hGH* a las neuronas de POMC en el Arc (Figura 9 arriba y centro) en total ausencia de las secuencias del promotor proximal, exones, intrones o regiones 3' flanqueantes del gen de *POMC* de ratón, demostrando que esta región distal de 4 kb contiene uno o más *enhancers* neuronales específicos y suficientes para dirigir la transcripción a neuronas hipotalámicas de POMC. Este resultado fue confirmado en tres líneas independientes de transgénicos que mostraron un promedio de 75% de neuronas positivas para POMC que coexpresaban el reportero *hGH* (Figura 9 centro). No se detectó expresión del reportero en los melanotrofos de la pituitaria (Figura 9 abajo). La ribosonda para hGH marcó intensamente los somatotrofos del lóbulo anterior de la pituitaria del ratón debido a la hibridación cruzada con el mensajero de la GH de ratón, complicando el análisis de expresión del transgén en los corticotrofos.

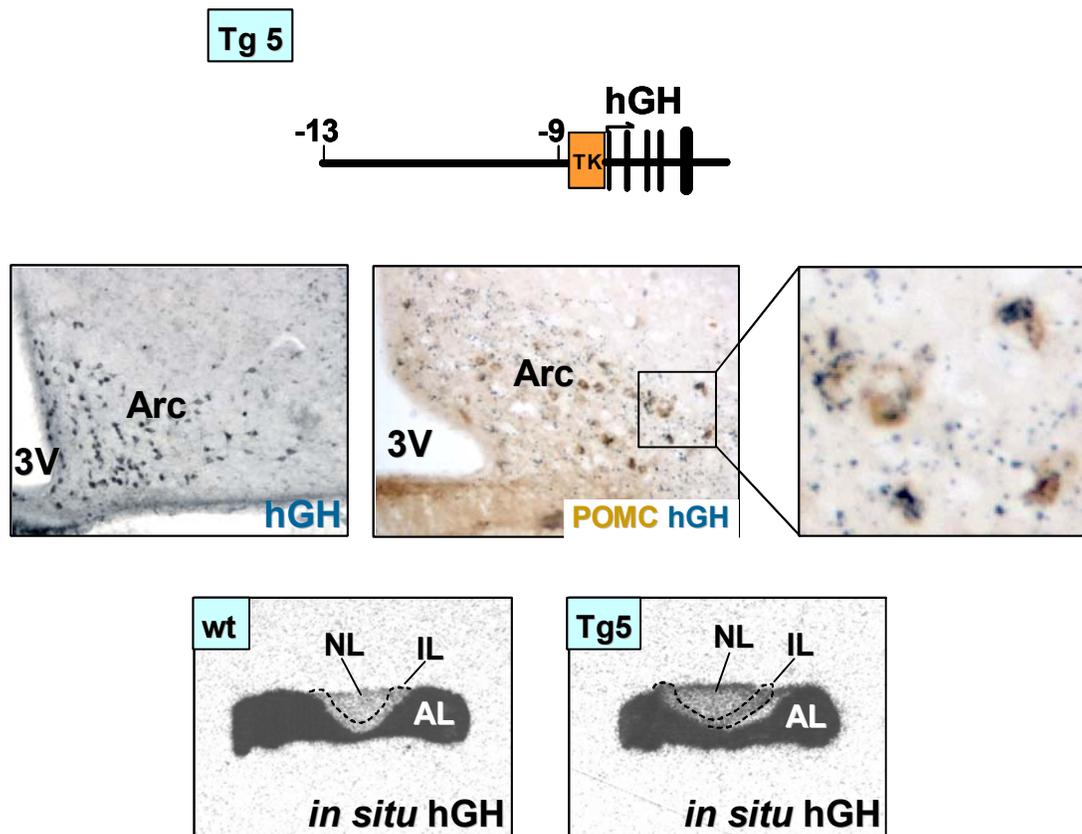


Figura 9: Expresión del gen reportero hGH en el Arc y en la glándula pituitaria de ratones transgénicos. Arriba) Esquema del transgén 5. Centro) Secciones coronales de cerebro de ratones que llevan el transgén 5. Izquierda) Inmunohistoquímica para hGH. Medio) Colocalización del ARNm de *POMC* y la proteína hGH. Las secciones fueron sometidas a hibridación *in situ* no radioactiva (marrón) para *POMC* seguido de inmunohistoquímica para hGH (gránulos azules). Derecha) Detalle de la figura anterior. Abajo) Autorradiografías de secciones coronales de pituitaria de un ratón no transgénico (*wt*, *wild-type*) y de uno transgénico (Tg 5) hibridadas con una ribosonda anti-hGH marcada con [35 S]. La sonda detectó el ARNm de GH endógena en el lóbulo anterior (AL) de ambas pituitarias, pero no en los lóbulos intermedio (IL) o neural (NL). Arc, núcleo arcuato. 3V, tercer ventrículo.

Se detectaron patrones variables de expresión ectópica del transgén en áreas que incluían el núcleo supraóptico del hipotálamo, el hipocampo, la habénula y la corteza cerebral (Figura 8, transgén 5).

Estos resultados demuestran que los elementos regulatorios neuronales distales localizados dentro de la secuencia de -13 a -9 kb de la región 5' flanqueante del gen de *POMC* de ratón pueden transactivar un gen reportero en neuronas hipotalámicas de *POMC* independientemente del promotor proximal necesario para la transactivación de *POMC* en células hipofisarias. Además la región de -13 a -9 kb de *POMC* de ratón tiene especificidad transcripcional aún actuando río arriba de un promotor heterólogo, mostrando independencia de la distancia al sitio de inicio de la transcripción, característica de los *enhancers*.

La región neuroespecífica de *POMC* contiene dos secuencias altamente conservadas entre el humano y el ratón

Los elementos regulatorios de la transcripción se encuentran generalmente más conservados entre los genomas de vertebrados que el promedio de las regiones intergénicas (Fickett y Wasserman, 2000; Thomas y Touchman, 2002). Por lo tanto, para identificar *enhancers* candidatos dentro de la región de -13 a -9 kb del gen de *POMC* de ratón se secuenció este fragmento de 4 kb para luego compararlo con la secuencia públicamente disponible del *locus* de *POMC* humano (este análisis se realizó antes de la publicación del genoma del ratón).

El programa DOTTER permitió visualizar globalmente alineamientos locales entre la región de -13 a -9 kb de *POMC* de ratón y extensas regiones 5' flanqueantes del gen de *POMC* humano y se identificaron dos regiones altamente conservadas entre las dos especies (Figura 10A). Además de la conservación observada entre las secuencias nucleotídicas, también las distancias entre las dos regiones y la de cada elemento al sitio de inicio de la transcripción resultó similar, indicando que la organización genómica del *locus* de *POMC* está conservada entre ambas especies (Figura 10B). A estas dos regiones, de aproximadamente 450 y 160 pb, las llamamos nPE1 y nPE2 por “*neuronal POMC enhancer*”. nPE1 tiene un porcentaje de identidad entre el ratón y humano de 65% y se encuentra aproximadamente a 12,2 y 10,5 kb de la *TATAA*box del ratón y del humano, respectivamente. nPE2 tiene un porcentaje de identidad del 90% y está localizado

a 9,9 y 8,9 kb de la *TATAA*box del ratón y del humano, respectivamente.

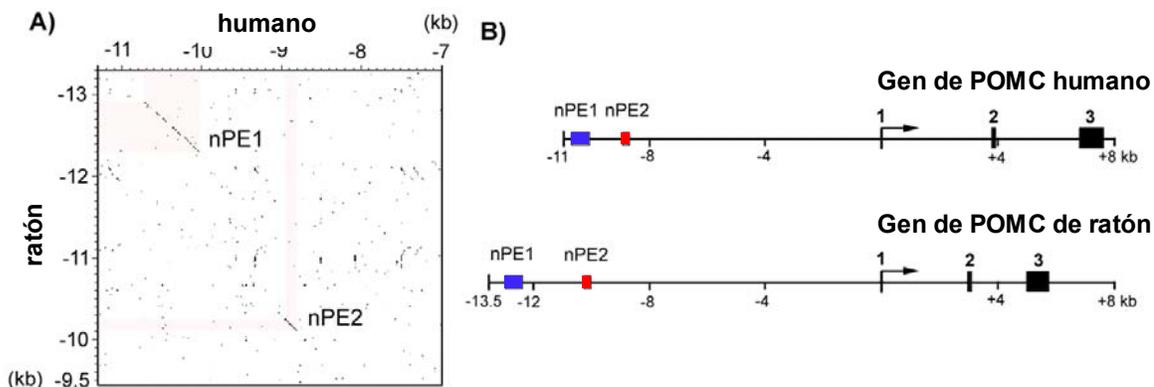


Figura 10: Identificación de los *enhancers* nPE1 y nPE2. **A)** Alineamiento local entre las regiones de -13 a -9 kb del gen de *POMC* de ratón (vertical) y de -11 a -7 kb del gen de *POMC* humano (horizontal) usando el programa DOTTER. La conservación en las secuencias se muestra como puntos negros en el gráfico y porciones conservadas colineales aparecen como diagonales. Dos regiones con alta identidad de secuencia están resaltadas: nPE1 (450 pb) y nPE2 (160 pb). **B)** Esquema del gen de *POMC* de ratón y humano que muestra las posiciones relativas de las regiones nPEs. Los tres exones de *POMC* están numerados.

nPE1 y nPE2 son necesarios para dirigir la expresión de transgenes a las neuronas de POMC en el arcuato

Dentro de la región entre -13 y -9 kb del promotor del gen de *POMC* de ratón nPE1 y nPE2 son las únicas secuencias no repetitivas que se han mantenido altamente conservadas a lo largo de los 65 a 85 millones de años que transcurrieron desde la separación de los linajes que condujeron al hombre y al ratón. Esta conservación sugiere que estos sitios podrían contener la información necesaria para asegurar la expresión neuronal específica del gen de *POMC*. Para probar esta hipótesis, se construyeron versiones delecionadas del transgén 1 original POMC-EGFP (Figura 11a) que se extiende de -13 a +8 kb del gen de *POMC* de ratón en las cuales nPE1, nPE2 o ambas secuencias simultáneamente fueron delecionados (Figura 11a, transgenes 7, 8 y 9). Con estos tres transgenes se produjeron múltiples líneas de ratones transgénicos para estudiar el papel que cumplen estas dos secuencias conservadas en la regulación de la transcripción

del gen de *POMC*.

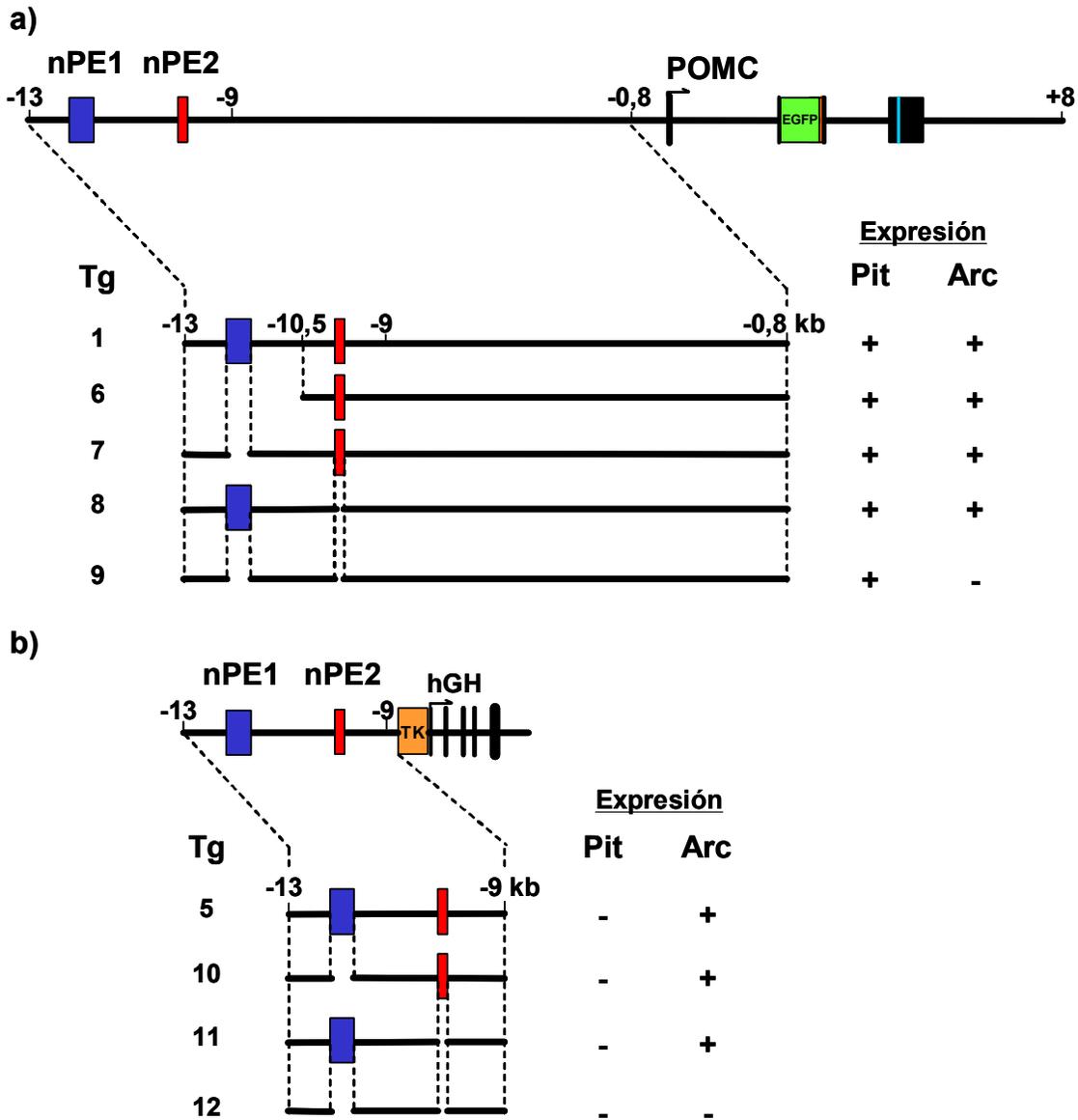


Figura 11: a) Esquema del transgén 1 mostrando las posiciones de nPE1 y nPE2. Esquema de transgenes de 6 a 9 con las deleciones realizadas entre -13 y -9 kb. Cajas negras: exones de *POMC*; caja verde: EGFP; caja roja: sitio de poliadenilación; caja azul: inserto heterólogo 30-mer para genotipificación. b) Esquema del transgén 5 mostrando las posiciones de nPE1 y nPE2. Esquema de transgenes de 10 a 12 con las deleciones realizadas entre -13 y -9 kb. La expresión positiva en corticotrofos y melanotrofos de la pituitaria (Pit) y en neuronas de POMC en el núcleo arcuato (Arc) del hipotálamo se indica + y su ausencia con un -.

La expresión de EGFP y la colocalización con POMC fueron determinadas en

secciones de cerebro y pituitaria de ratones transgénicos. Aquellos con el transgén 7 (carente de nPE1) o el transgén 8 (carente de nPE2) expresaron EGFP en neuronas hipotalámicas de POMC (Figura 12 arriba, transgenes 7 y 8). De manera similar, un transgén truncado que comprende de -10.5 a +8 kb del gen de *POMC* de ratón (Figura 11a, transgén 6) que no incluye a nPE1, también dirige la expresión de EGFP a neuronas de POMC en el Arc. Estos resultados demuestran que la ausencia de nPE1 o de nPE2 no impide la expresión de genes reporteros en neuronas hipotalámicas de POMC e indican que ni nPE1 ni nPE2 son, por sí solos, imprescindibles para garantizar esta expresión neuronal específica.

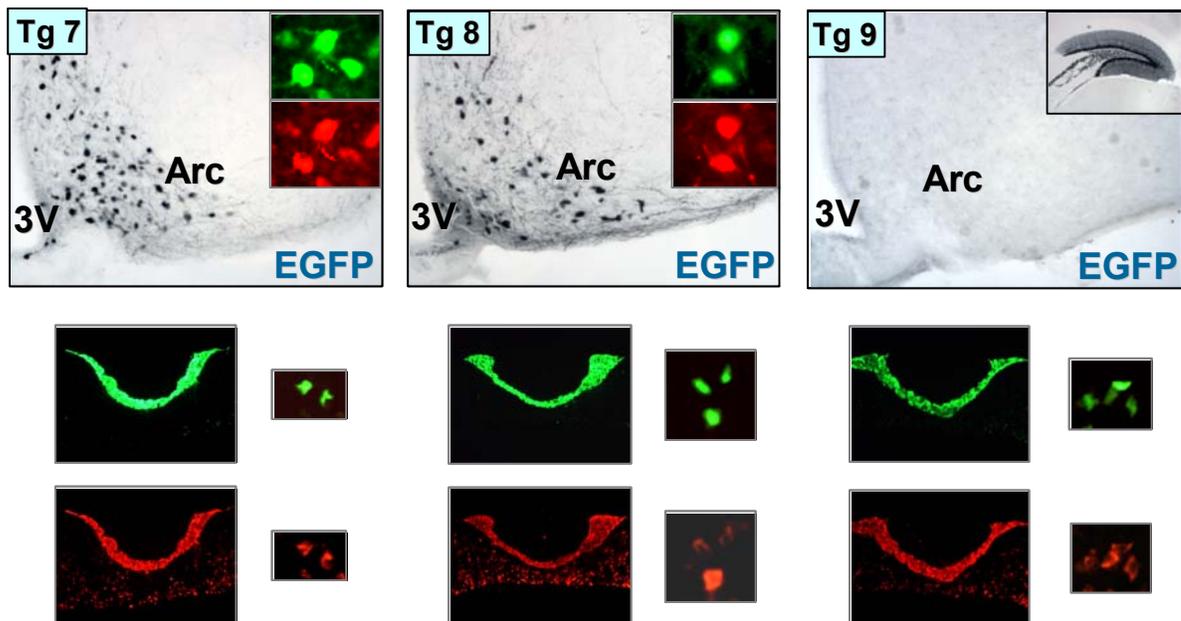


Figura 12: Los *enhancers* nPEs son necesarios para la expresión de *POMC* en el Arc del hipotálamo. **Arriba:** secciones coronales de cerebros de ratones transgénicos inmunomarcadas para EGFP. Los detalles en los Tg 7 y 8 muestran la colocalización fluorescente entre EGFP (fluorescencia verde) y ACTH (inmunofluorescencia roja). El detalle en el Tg 9 muestra expresión ectópica en el giro dentado del hipocampo. **Abajo:** secciones coronales de pituitarias de ratones transgénicos. Panel superior, fluorescencia de EGFP (verde). Panel inferior, inmunofluorescencia de ACTH (roja). Los detalles a la derecha muestran colocalización en corticotrofos del lóbulo anterior de la hipófisis. Arc, núcleo arcuato. 3V, tercer ventrículo.

La delección simultánea de nPE1 y nPE2, sin embargo, eliminó completamente la expresión de EGFP en neuronas de POMC en el Arc en cinco líneas independientes de ratones transgénicos (Figura 12, transgén 9). Todas las líneas generadas con los transgenes 6, 7, 8 y 9 mostraron expresión de EGFP en melanotrofos y corticotrofos de la pituitaria (Figura 12, abajo), confirmando que la regulación transcripcional de *POMC* en el cerebro es independiente de la que actúa en la pituitaria y esta controlada en cada órgano por grupos de *enhancers* diferentes separados por una decena de kilobases. Estos resultados en su conjunto indican que nPE1 y nPE2 funcionan como *enhancers* transcripcionales neuronales que son necesarios para la expresión de *POMC* en las neuronas del Arc. La ausencia de cualquiera de ellos no inhibe la expresión del transgén en las neuronas de POMC en el Arc, indicando cierta redundancia funcional entre nPE1 y nPE2.

Para confirmar la importancia de estos *enhancers* en dirigir la expresión de genes reporteros a neuronas de POMC en el Arc, se realizaron delecciones de nPE1, nPE2, o ambos nPEs simultáneamente en el transgén 5 original (Figura 11b) en el cual el promotor mínimo de la TK viral está fusionado al gen reportero *hGH* (Figura 11b, transgenes 10, 11 y 12). De manera similar a los resultados anteriores, la delección de nPE1 o nPE2 solamente no impide la expresión del reportero *hGH* en las neuronas de POMC en el Arc. Sin embargo, la delección simultánea de ambos nPEs suprime completamente la expresión de *hGH* en las neuronas de POMC en el Arc en las cinco líneas independientes de ratones transgénicos generados, tal como se muestra en el ensayo de inmunohistoquímica de la Figura 13.

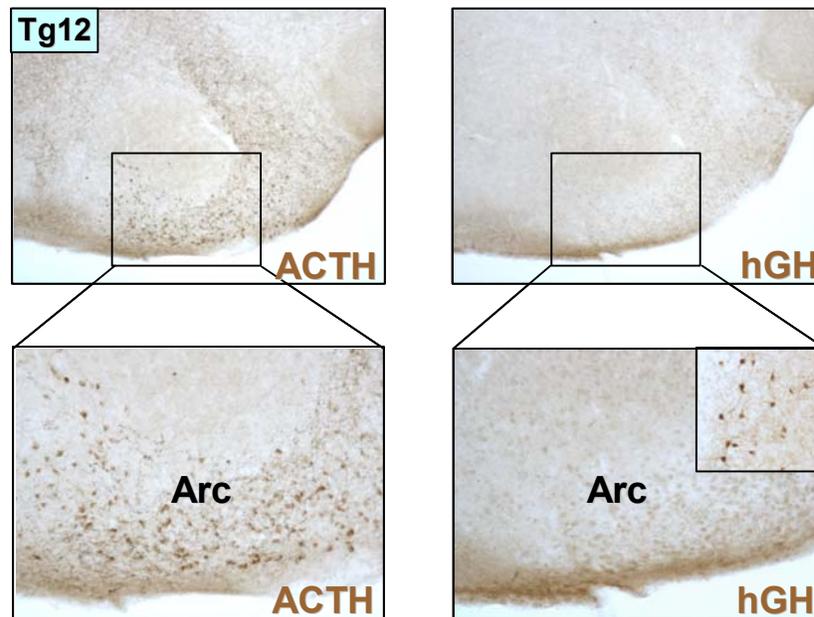


Figura 13: Los *enhancers* nPEs son necesarios para la expresión de *POMC* en el núcleo arcuato del hipotálamo. Inmunohistoquímica de cortes sagitales seriales de cerebros de ratones con el transgén 12. El núcleo arcuato expresa ACTH pero no el reportero *hGH*. El detalle abajo muestra expresión ectópica de *hGH* alrededor de la comisura anterior en la misma sección de cerebro. Arc, núcleo arcuato.

Para estudiar si además de funcionar como *enhancers* nPE1 o nPE2 son represores transcripcionales en otro tipo neuronal, se analizaron los patrones de expresión transgénica en todo el cerebro. No se observó la presencia de ningún patrón de expresión que pudiera indicar esta posibilidad. Las distintas líneas de transgénicos presentaron una expresión ectópica muy variable y peculiar en cada una de ellas (Figura 14). Los ratones transgénicos generados con las construcciones 10, 11 y 12 no mostraron expresión del gen reportero en los melanotrofos de la pituitaria. Las líneas que llevaban el transgén 12 con la delección de ambos nPEs, mostraron expresión ectópica en otras regiones del cerebro, como por ejemplo la comisura anterior (figura 14, transgén 12) mostrando que el transgén no se insertó en regiones transcripcionalmente silenciosas del genoma. Estos resultados demuestran definitivamente que nPE1 y nPE2 son las secuencias responsables de otorgar la actividad *enhancer* neuronal en la región

de -13 a -9 kb de la región 5' flanqueante del gen de POMC de ratón.

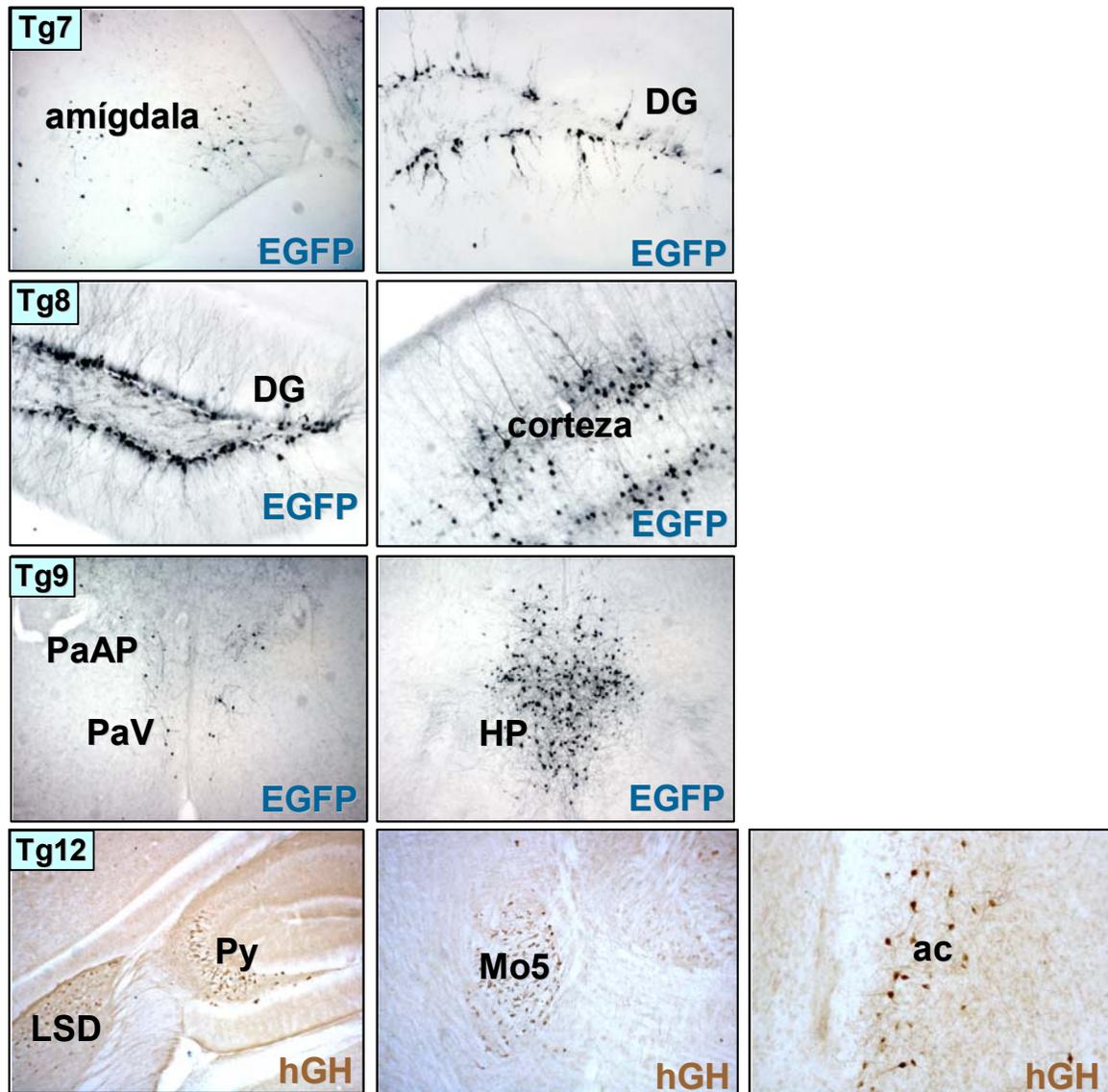


Figura 14: Expresión ectópica del reportero *EGFP* (inmunomarcación azul) en los transgenes 7, 8 y 9 y del *hGH* (inmunomarcación marrón) en el transgén 12. Amígdala, área amigdalohipocampal. DG, giro dentado del hipocampo. corteza, corteza cerebral. PaAP, núcleo paraventricular del hipotálamo parte anterior. PaV, núcleo paraventricular del hipotálamo parte ventral. PH hipotálamo posterior. Py, capa de células piramidales del hipocampo. LSD, núcleo septal lateral parte dorsal. Mo5, núcleo motor del trigémino. ac, comisura anterior.

Conservación funcional del *enhancer* neuronal de *POMC* humano en ratones transgénicos

Para determinar si la región de *POMC* homóloga humana que contiene nPE1 y nPE2 tiene también la capacidad funcional de dirigir la expresión de transgenes a las neuronas de POMC en el arcuato, construimos un transgén en el cual la región entre -11 y -8 kb del gen de *POMC* humano (conteniendo ambas secuencias nPEs) fue ligada río arriba del promotor mínimo del gen de β -globina de pollo seguido del gen reportero β -galactosidasa de *E. coli*, *lacZ* (Figura 15).

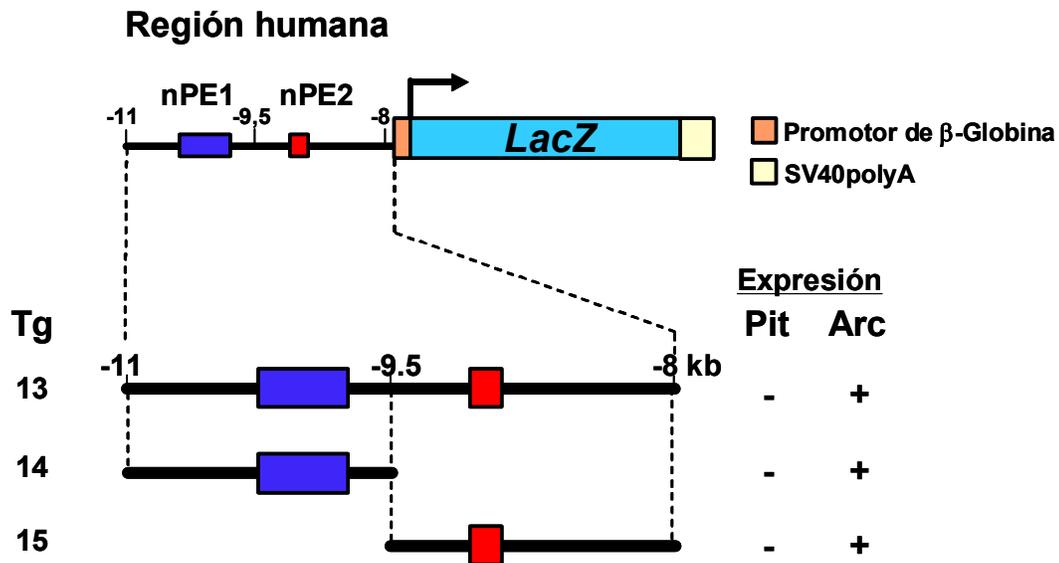


Figura 15: Esquema del transgén 13. La región entre -11 y -8 kb del gen de *POMC* humano fue ligada río arriba del promotor mínimo de β -globina de pollo seguido del gen reportero β -galactosidasa de *E. coli*, *LacZ*. Se muestran los transgenes de 13 a 15 con las delecciones realizadas entre -11 y -8 kb del *POMC* humano. La expresión positiva en neuronas de POMC en el Arc del hipotálamo se indica + y su ausencia con -.

La actividad de β -galactosidasa fue visualizada *in situ* seguida de una inmunohistoquímica contra ACTH en secciones coronales de cerebros de ratones transgénicos de tres líneas independientes. La tinción azul con X-Gal fue evidente en neuronas del arcuato positivas para POMC (Figura 16 arriba, transgén 13) aunque el porcentaje de colocalización fue altamente variable entre las tres líneas

analizadas (10, 68 y 95%). No se detectó expresión del transgén en corticotrofos ni en melanotrofos de la pituitaria (Figura 16 abajo, transgén 13). Dos versiones truncadas del transgén 13, conteniendo solamente nPE1 (Figura 15, transgén 14) o nPE2 (transgén 15) mostraron similares niveles de colocación en neuronas del arcuato (Figura 16 arriba; tabla complementaria 1). No se observó expresión transgénica en células hipofisarias de POMC (Figura 16 abajo). Algunas líneas de ratones transgénicos mostraron expresión ectópica en el lóbulo neural (Figura 16 abajo, transgenes 13 y 15).

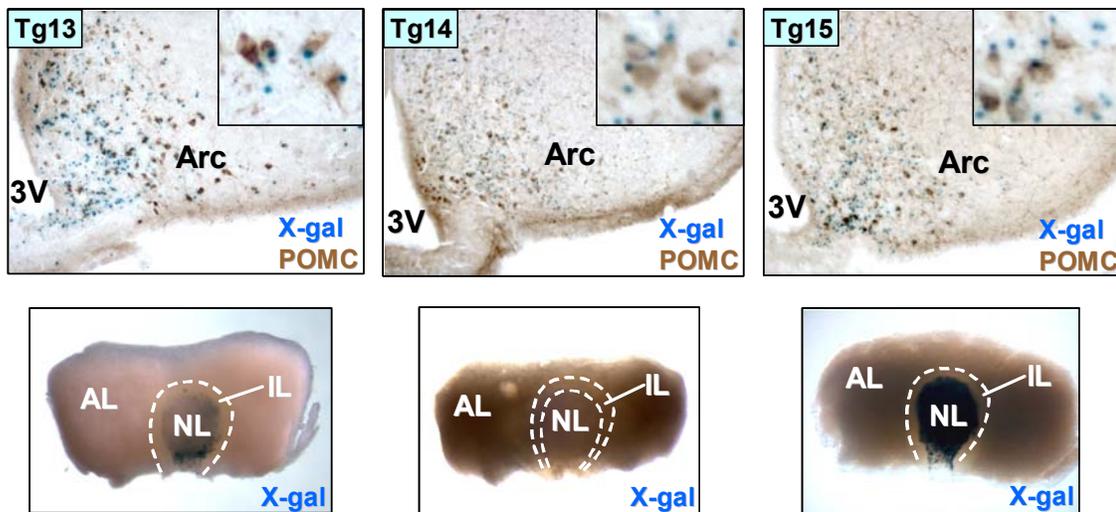


Figura 16: Conservación funcional de los nPEs de la región humana. **Arriba:** colocación entre la expresión del transgén (tinción con X-gal, celeste) y ACTH (inmunohistoquímica, marrón) de secciones de cerebro de ratón con los transgenes 13, 14 y 15. Los detalles muestran la colocación de ambas señales. **Abajo:** pituitarias enteras teñidas con X-gal. Se observa expresión ectópica en el lóbulo neural (NL) en las pituitarias que llevan los transgenes 13 y 15. Arc, núcleo arcuato. 3V, tercer ventrículo. AL, lóbulo anterior. NL, lóbulo neural. IL, lóbulo intermedio.

Diferentes niveles de expresión ectópica fueron observados en el cerebro de cada línea de transgénicos en regiones que incluyen amígdala, habénula, corteza cerebral, núcleo arcuato, ventromedial y lateral del hipotálamo (Figura 17), además de células del lóbulo neural de la hipófisis (Figura 16, abajo). Estos resultados indican que los mecanismos moleculares involucrados en la expresión de *POMC* en el hipotálamo humano y de ratón están conservados.

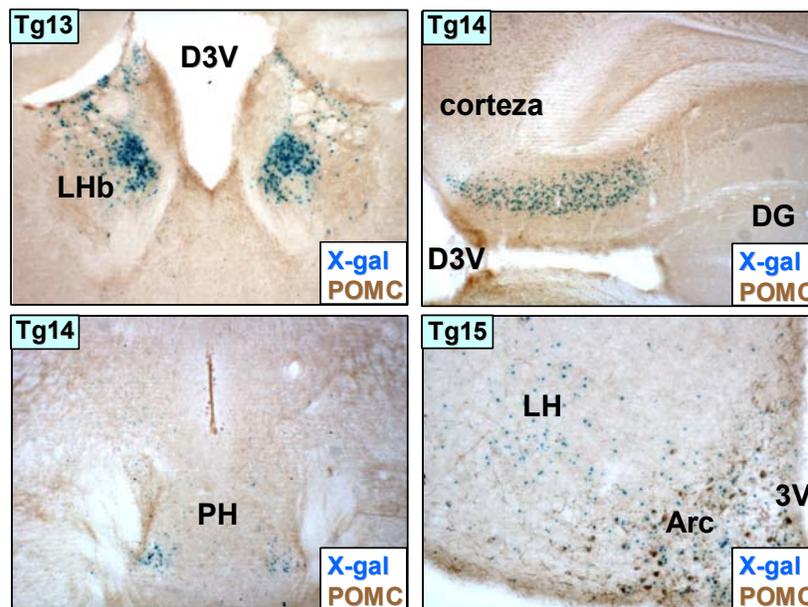


Figura 17: Expresión ectópica de los transgenes 13, 14 y 15. D3V, tercer ventrículo parte dorsal. LHb, habénula lateral. corteza, corteza cerebral. DG, giro dentado del hipocampo. PH hipotálamo posterior. LH, hipotálamo lateral. 3V, tercer ventrículo. Arc, núcleo arcuato.

nPE1 y nPE2 están conservados en mamíferos pero no en otros vertebrados

Dado que el gen de *POMC* se expresa en neuronas del hipotálamo ventromedial de todas las especies de vertebrados estudiadas hasta el momento, se investigó si los elementos regulatorios nPE1 y nPE2 están conservados en los diferentes clases de vertebrados. Para ello se obtuvieron secuencias disponibles de *POMC* de los proyectos genoma de diferentes mamíferos (chimpancé, macaco, ratón, rata, perro, vaca y el marsupial sudamericano *Opposum*), de la gallina, del anfibio *Xenopus tropicalis* y de los peces teleósteos *Takifugu rubripes* (Fugu) y *Danio rerio* (Zebrafish). Utilizando el programa PipMaker (Schwartz *et al.*, 2000) se calculó el porcentaje de identidad entre cada una de las distintas especies y el *locus* de *POMC* humano (figura 18). Todas las secuencias de mamíferos mostraron una alta identidad con el *locus* humano de *POMC*, incluyendo varios bloques no codificantes, entre éstos, nPE1 y nPE2 particularmente muestran un mayor porcentaje de identidad en comparación con aquellas regiones intergénicas o intrónicas que tiene menor grado de conservación.

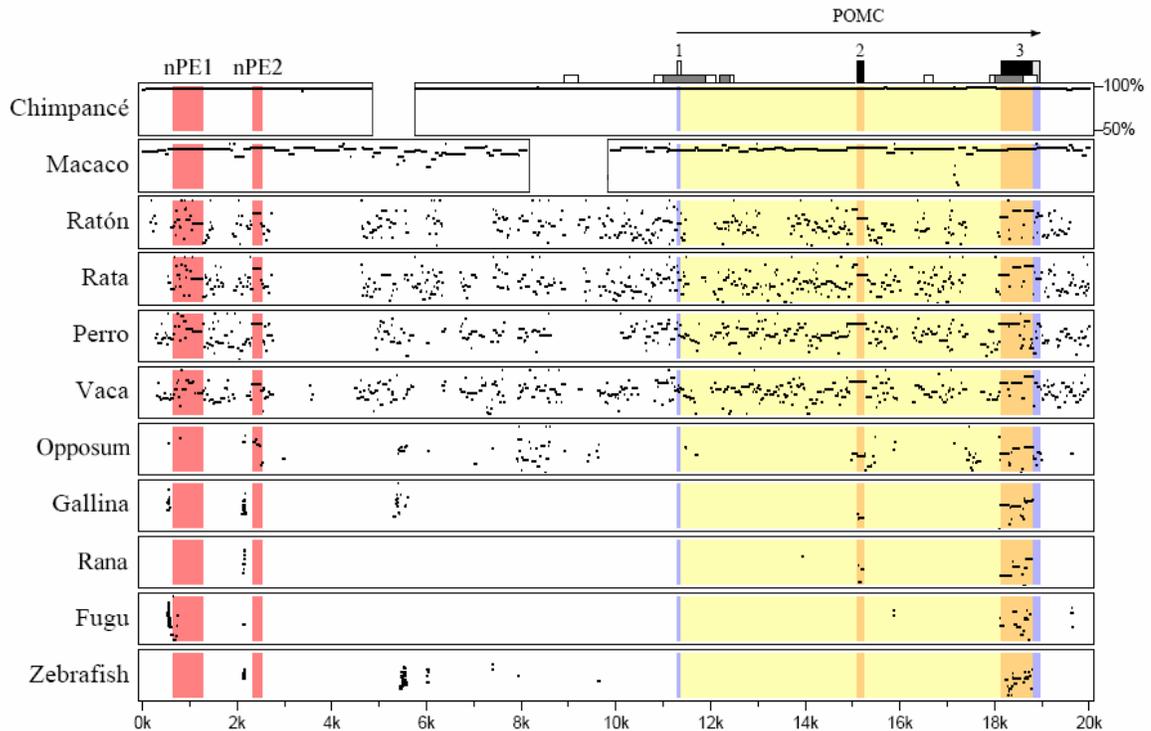


Figura 18: Conservación de los *enhancers* neuronales de *POMC*. Alineamiento local del gen de *POMC* humano con varias especies usando el programa PipMaker. El gen de *POMC* humano incluyendo 12 kb de la secuencia 5' fue comparado con regiones equivalentes del chimpancé (*Pan troglodytes*), Macaco (*Macaca mulatta*), ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*), perro (*Canis familiaris*), vaca (*Bos taurus*), Opposum (*Monodelphis domestica*), gallina (*Gallus gallus*), Rana (*Xenopus tropicalis*) y los peces teleósteos Fugu (*Takifugu rubripes*) y Zebrafish (*Danio rerio*). Los nPE1 y nPE2 están indicados en color rojo. Para cada especie el alineamiento con la secuencia humana está graficado como la longitud de la secuencia en función del porcentaje de identidad (entre 50 y 100%) para cada segmento alineado. En el gráfico, segmentos cortos no codificantes que aparecen conservados entre los mamíferos y los no mamíferos son generalmente simples repeticiones, por ejemplo (AT)_n, (GT)_n.

El *locus* de *POMC* de chimpancé es prácticamente idéntico al humano tanto en regiones codificantes como no codificantes, como es esperado por la corta distancia evolutiva entre estas dos especies de primates. Por el contrario, los genes de *POMC* de especies no mamíferas, sólo mostraron identidad de secuencia significativa con el *locus* de *POMC* humano en los exones 2 y 3 (gallina

y rana) y exclusivamente en el exón 3 en los peces teleósteos. Estos datos muestran que las secuencias de nPE1 y nPE2 están fuertemente conservadas entre mamíferos pero no fuera de esta clase. Es importante destacar que nPE1 sólo está conservado en mamíferos placentarios, mientras que nPE2 está conservado también en mamíferos no placentarios como *Monodelphis domestica*.

La búsqueda de secuencias similares a nPE1 y nPE2 en los genomas de ratón y humano utilizando el programa BLASTn mostró que estas secuencias son únicas.

Elementos regulatorio de nPE1 y nPE2

De acuerdo a los resultados funcionales obtenidos, el hecho de que nPE1 y nPE2 tengan la capacidad de dirigir la expresión de transgenes reporteros selectivamente al mismo grupo de neuronas hipotalámicas de POMC sugiere que ambos *enhancers* compartirían al menos una región de homología o una combinación común de TFBS. La comparación exhaustiva entre nPE1 y nPE2 de ratón fue realizada con el programa Paircomp (Brown *et al.*, 2005), que compara ventanas correlativas de 10 nucleótidos de una secuencia con la totalidad de la otra secuencia en ambas orientaciones. El análisis se puede visualizar con la herramienta Family Relations II. Se encontró una única secuencia de 27 nucleótidos con una identidad del 75% entre nPE1 y nPE2 (Figura 19).

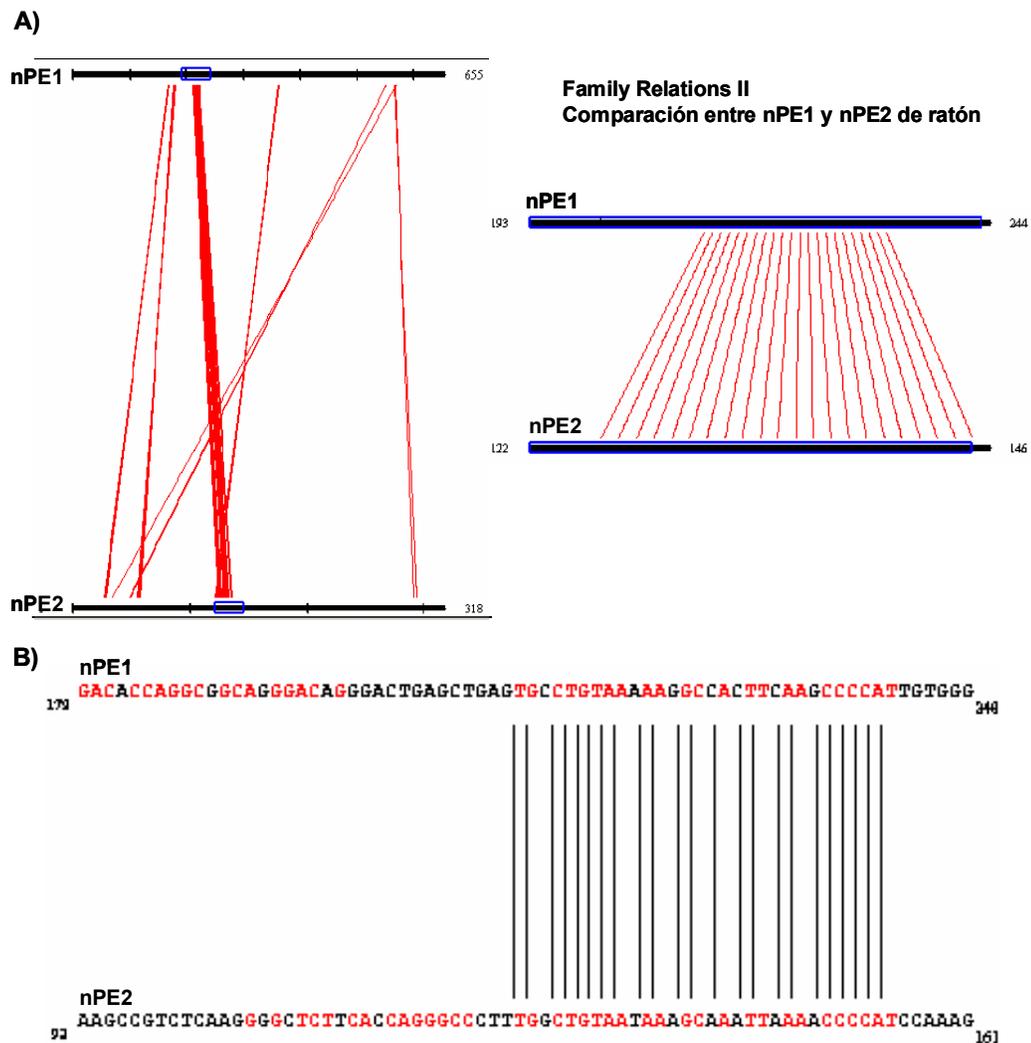


Figura 19: Comparación entre nPE1 y nPE2 de ratón utilizando el programa Family Relations II. **A)** A la izquierda se muestra el alineamiento. Los nucleótidos que presentan identidad se señalan con líneas rojas. A la derecha, se muestra un acercamiento de la zona de mayor identidad. **B)** Se muestra la secuencia alineada de la zona con mayor identidad.

Para detectar posibles TFBS dentro de las secuencias de nPE1 y nPE2 de ratón se utilizó el programa MatInspector (Genomatix) y rVISTA para compararlas con la base de datos *TRANSFAC*. Para reducir el alto número de falsos positivos obtenidos, tuvimos en cuenta los bloques de secuencia conservados entre varias especies de mamíferos utilizadas en el alineamiento múltiple global realizado con ClustalW2.0 (Figura 20).

nucleares huérfanos. Otro sitio canónico para $ERR\alpha$ fue encontrado en la región 3' terminal de nPE2. Como se puede observar, los programas utilizados no detectaron potenciales TFBS comunes entre nPE1 y nPE2 bajo las estrictas condiciones definidas, incluso en la región con alta identidad entre nPE1 y nPE2 identificada por el programa Paircomp (recuadrada en gris en la figura 20). De todas maneras, es posible que nPE1 y nPE2 sean reconocidos por combinaciones de FTs diferentes. Los análisis *in silico* realizados para predecir secuencias con una potencial relevancia funcional dan resultados especulativos que deben ser confirmados experimentalmente. Para acotar las secuencias regulatorias que dirigen la activación de la transcripción exclusivamente a neuronas hipotalámicas de POMC, se realizó un nuevo grupo de experimentos funcionales *in vivo*. Se continuó el estudio con el *enhancer* nPE2 debido a su alta conservación en toda la clase Mamalia.

Conservación del *enhancer* nPE2 en los mamíferos

El acelerado avance de nuevos proyectos genoma permite acceder a secuencias genómicas de una multiplicidad de especies animales. La secuencia de nPE1 y nPE2 de ratón se utilizó para correr el programa BLASTn y así examinar el genoma de distintos mamíferos placentarios, del marsupial *Monodelphis domestica* (http://www.ensembl.org/Monodelphis_domestica/), del monotremado *Ornithorhynchus anatinus*. Secuencias con porcentajes altos de identidad a nPE2 fueron identificadas en todas las especies de mamíferos. Un alineamiento múltiple con ClustalW2.0 del *enhancer* nPE2 (Figura 21) mostró dos regiones de 12 y 14 pb que son idénticas en todas las especies (AAGCAAATTAAA) y (AAGGTCAATTGAAA). En el genoma de *M. domestica* se encontró un *scaffold* (número15082) de 49,5 kb que contiene al gen completo de POMC. Dentro de este *scaffold* se detectó la secuencia altamente conservada con nPE2. Sin embargo, nPE1 no pudo ser detectado dentro de todo el *scaffold* (Figura 22). La comparación de nPE1 de ratón con todo el genoma de *M. domestica* utilizando BLASTn tampoco mostró la existencia de secuencias conservadas con este *enhancer*. En *O. anatinus* también se detectó una secuencia conservada con

nPE2 pero no con nPE1. Estos resultados indican que nPE2 está fuertemente conservado en toda la clase Mamalia pero nPE1 sería una adquisición más reciente de mamíferos placentarios.

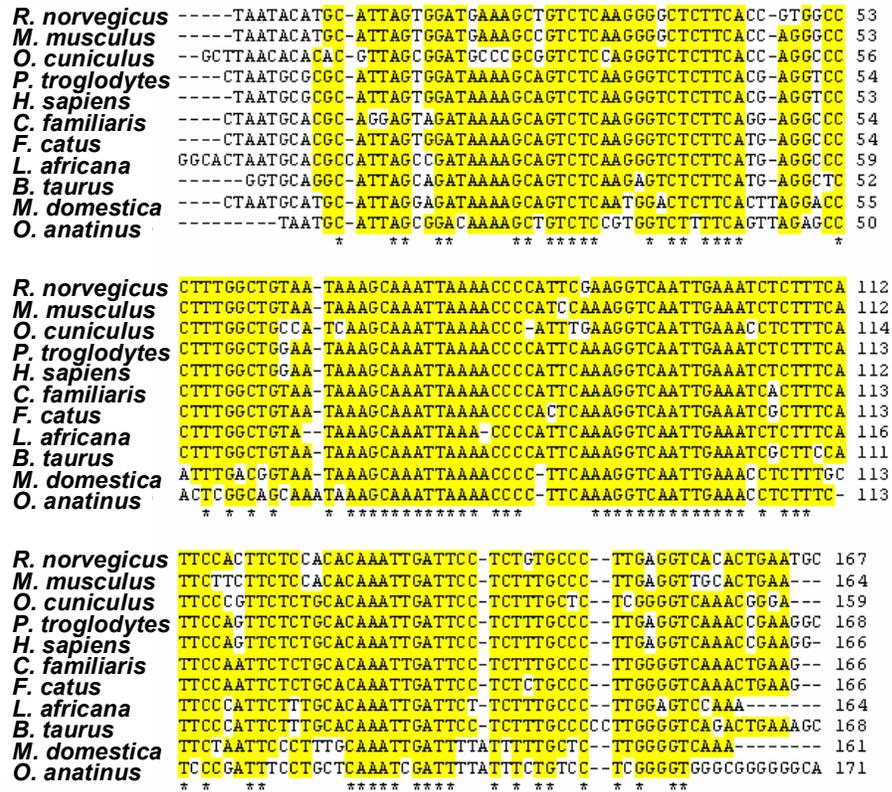


Figura 21: Alineamiento global múltiple utilizando la herramienta ClustalW2.0 de la secuencia de nPE2 de distintas especies de mamíferos. Las bases idénticas en todas las especies se señalan con un (*) y las conservadas en la mayoría de las especies están en amarillo.

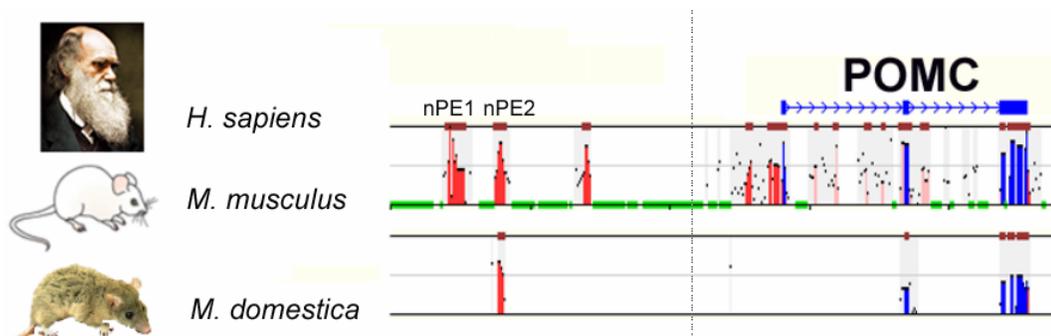


Figura 22: Alineamiento del gen de POMC en tres especies de mamíferos utilizando la herramienta de visualización ECRBrowser. Arriba, comparación de humano con ratón, se observan nPE1 y nPE2. Abajo, comparación de humano con *M. monodelphis*, sólo se detecta nPE2.

Diseción funcional del *enhancer* nPE2

Expresión durante el desarrollo embrionario

El *enhancer* neuronal nPE2 es capaz de dirigir la expresión específica de genes reporteros a células de POMC en el Arc del hipotálamo en ausencia de nPE1 (transgenes 6, 7, 10 y 15). Para identificar las secuencias críticas de nPE2 involucradas en esta expresión específica, se realizó una serie de deleciones dentro de las 160 pb del nPE2 de ratón. Primeramente, un fragmento de 1,5 kb de la región entre -10,4 y -9 kb del gen de POMC de ratón, que contiene a nPE2, fue ligado río arriba del promotor mínimo del gen de β -globina de pollo seguido del gen de β -galactosidasa de *E. coli*, *lacZ* (Figura 23A, transgén 16). El análisis de la expresión del gen reportero se realizó en secciones de cerebro de ratones adultos a través de tinción con X-gal seguido de inmunohistoquímica para ACTH para determinar la posible expresión de β -galactosidasa en neuronas hipotalámicas de POMC. Los ratones transgénicos portadores del fragmento de -10,4 a -9 kb mostraron expresión de β -galactosidasa en neuronas de POMC del Arc con porcentajes variables de colocalización (45, 61 y 68 %, tabla complementaria 2) en tres líneas independientes de ratones transgénicos (Figura 23B). Este transgén también se expresó ectópicamente en distintas partes del cerebro con un patrón variable entre las distintas líneas independientes. Dado que el transgén cuenta con sólo 1,4 kb de *POMC* que incluyen al *enhancer* nPE2, es posible que otras secuencias más allá de esta región sean necesarias para que el reportero se exprese *exclusivamente* en las neuronas de POMC en el Arc.

Estos resultados demuestran que un fragmento de sólo 1,4 kb que contiene al *enhancer* neuronal nPE2 es *suficiente* para dirigir la expresión de un gen reportero a neuronas de POMC del Arc del hipotálamo y confirman que esta capacidad es independiente de la actividad de nPE1.

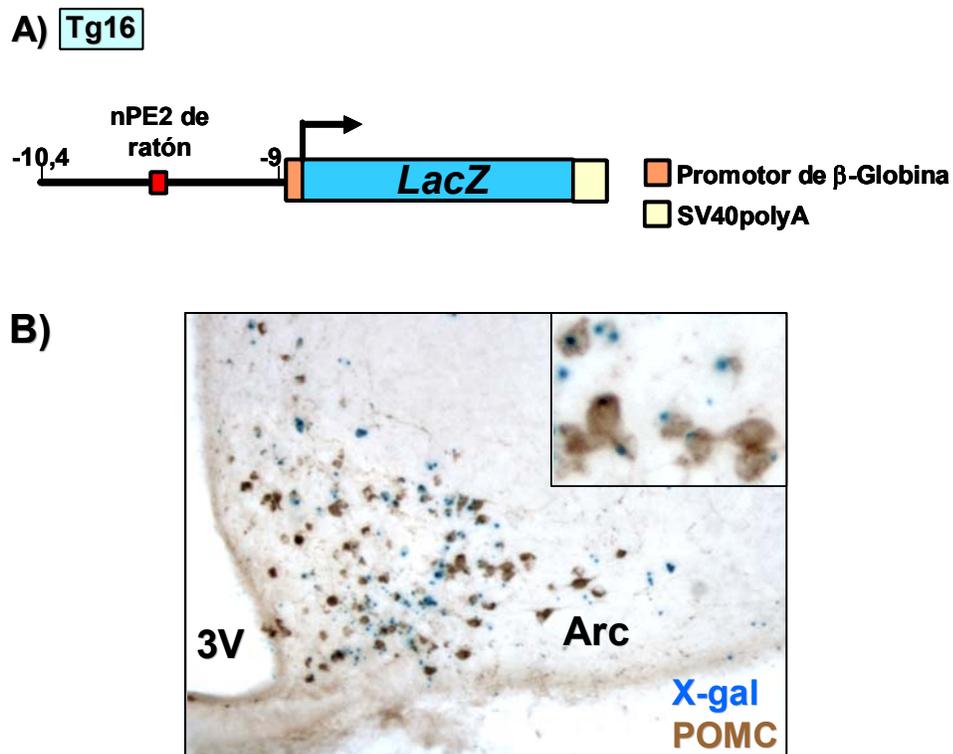


Figura 23: A) Esquema del transgén 16. La región entre $-10,4$ y -9 kb del gen de *POMC* de ratón fue ligada río arriba del promotor mínimo de β -globina de gallina seguido del gen reportero *LacZ*. **B)** Colocalización entre la expresión del transgén (tinción con X-gal, celeste) y ACTH (inmunohistoquímica, marrón) en secciones de cerebro de ratón con el transgén 16. El detalle muestra colocalización en varias neuronas.

El análisis de la expresión del transgén en distintos estadios del desarrollo embrionario demostró que este *enhancer* tiene la capacidad de controlar de la expresión de *POMC* en la base del diencefalo que da origen al hipotálamo adulto. La expresión de *POMC* en el ratón comienza al día embrionario 10,5 (E10.5) (Japón *et al.* 1994). En la figura 24 se observa expresión del transgén a partir del E10.5 en coincidencia con *POMC* en la base del diencefalo y también en los estadios posteriores estudiados (E10.5, E12.5 y E14.5). Las 3 líneas de ratones transgénicos también mostraron expresión ectópica en los somitos a ambos lados de la columna vertebral y en la retina durante el desarrollo ontogénico (Figura 24). Además, se observó expresión ectópica variable en otras regiones del embrión pero sin un patrón definido de expresión.

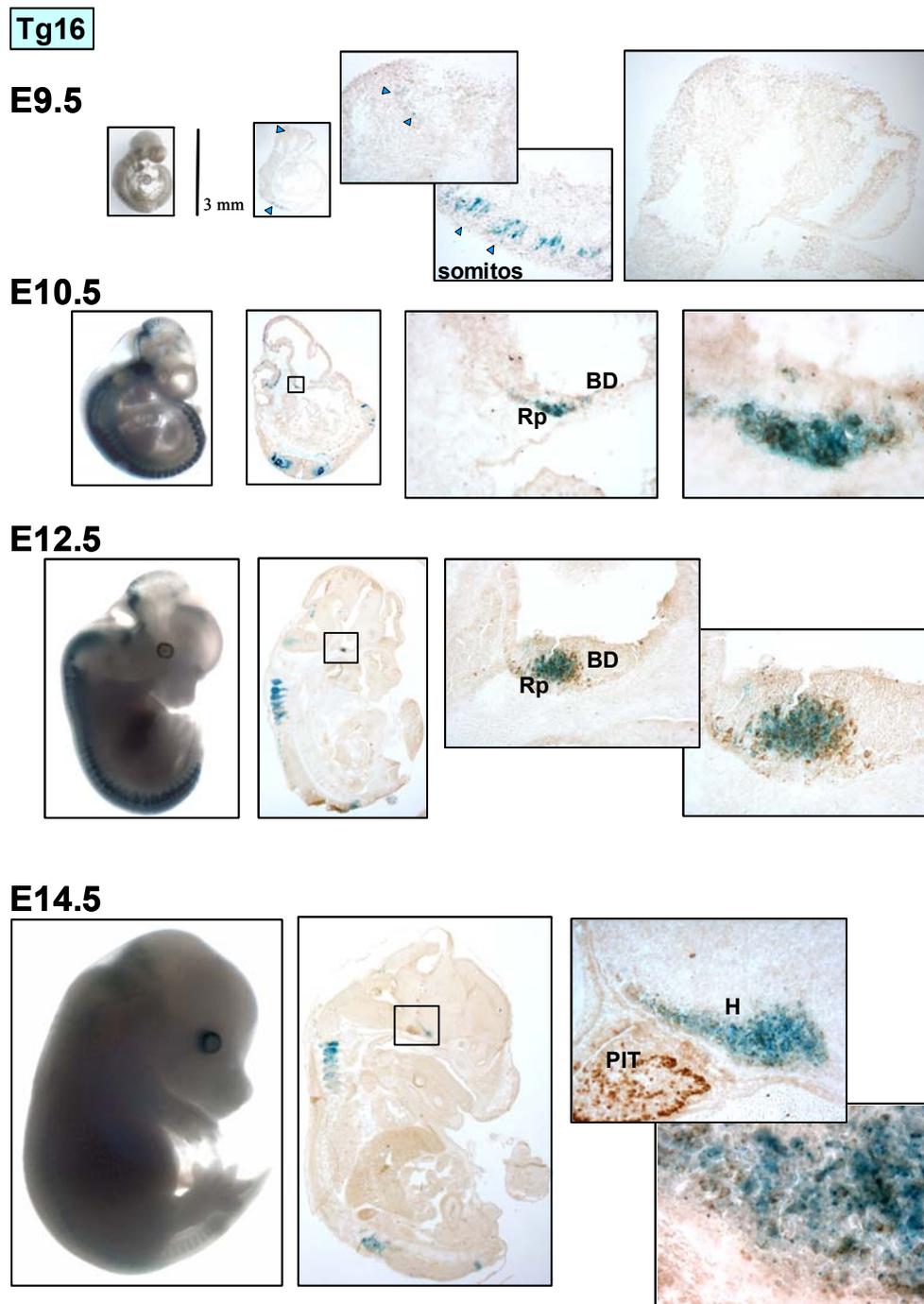
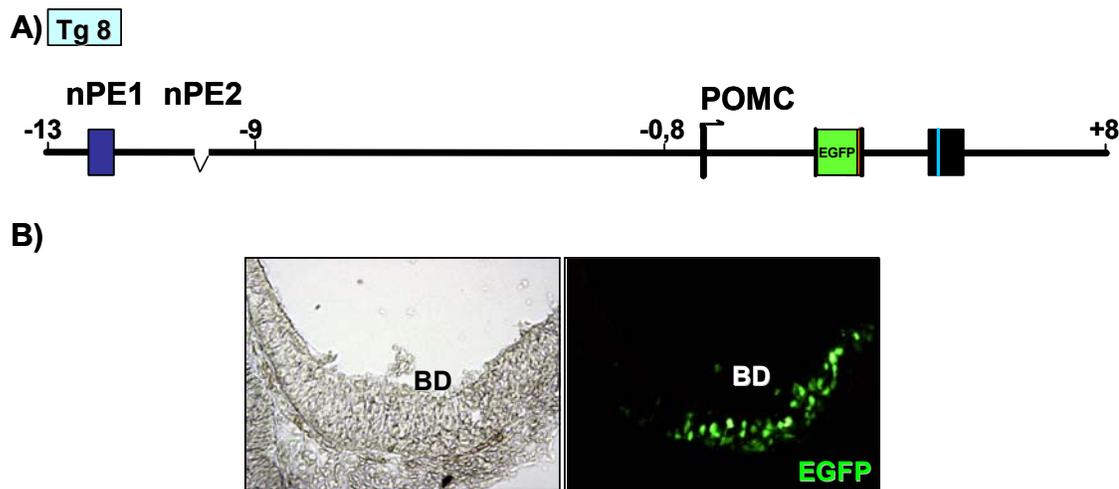


Figura 24: El patrón de expresión del transgén dirigido por nPE2 coincide con la expresión del gen de *POMC* endógeno durante el desarrollo embrionario. El panel de la izquierda muestra embriones enteros teñidos con X-gal. El panel de la derecha muestra la colocalización del transgén (tinción con X-gal, celeste) y *POMC* endógeno (inmunohistoquímica para ACTH, marrón) en secciones de los mismos embriones. BD, diencefalo basal. Rp, bolsillo de Rathke. PIT, pituitaria. H, hipotálamo.

Para estudiar si nPE1 también es capaz de controlar la expresión transgénica durante el desarrollo embrionario, se analizaron embriones transgénicos de E11.5 portadores del transgén 8 (-13/+8 POMC-EGFP con delección del elemento nPE2; Figura 25). Los resultados mostraron que el *enhancer* nPE1 también puede dirigir la expresión transgénica temprana al diencéfalo basal del embrión.



Figuras 25: Expresión del reportero EGFP en el diencéfalo basal de un embrión transgénico de E11.5 portador del transgén 8. **A)** Esquema del transgén 8. **B)** Izquierda, fotografía en campo claro. Derecha, fotografía bajo luz UV.

Estrategia utilizada para el análisis delecional de nPE2

Demostrada la capacidad del *enhancer* nPE2 para dirigir la expresión del gen reportero específicamente a neuronas de POMC en el Arc con un patrón temporal y espacial idéntico al del gen endógeno, se decidió analizar cuáles son las secuencias críticas dentro de nPE2 que confieren esta especificidad transcripcional. El *enhancer* nPE2 fue dividido en 5 regiones solapadas tal como se muestra en el esquema de la figura 26. Las delecciones fueron realizadas utilizando la técnica de PCR con Megaprimers (ver Materiales y métodos). La ubicación de los primers utilizados para realizar cada una de las delecciones se muestra en el esquema de la figura 37B de la sección Materiales y métodos.

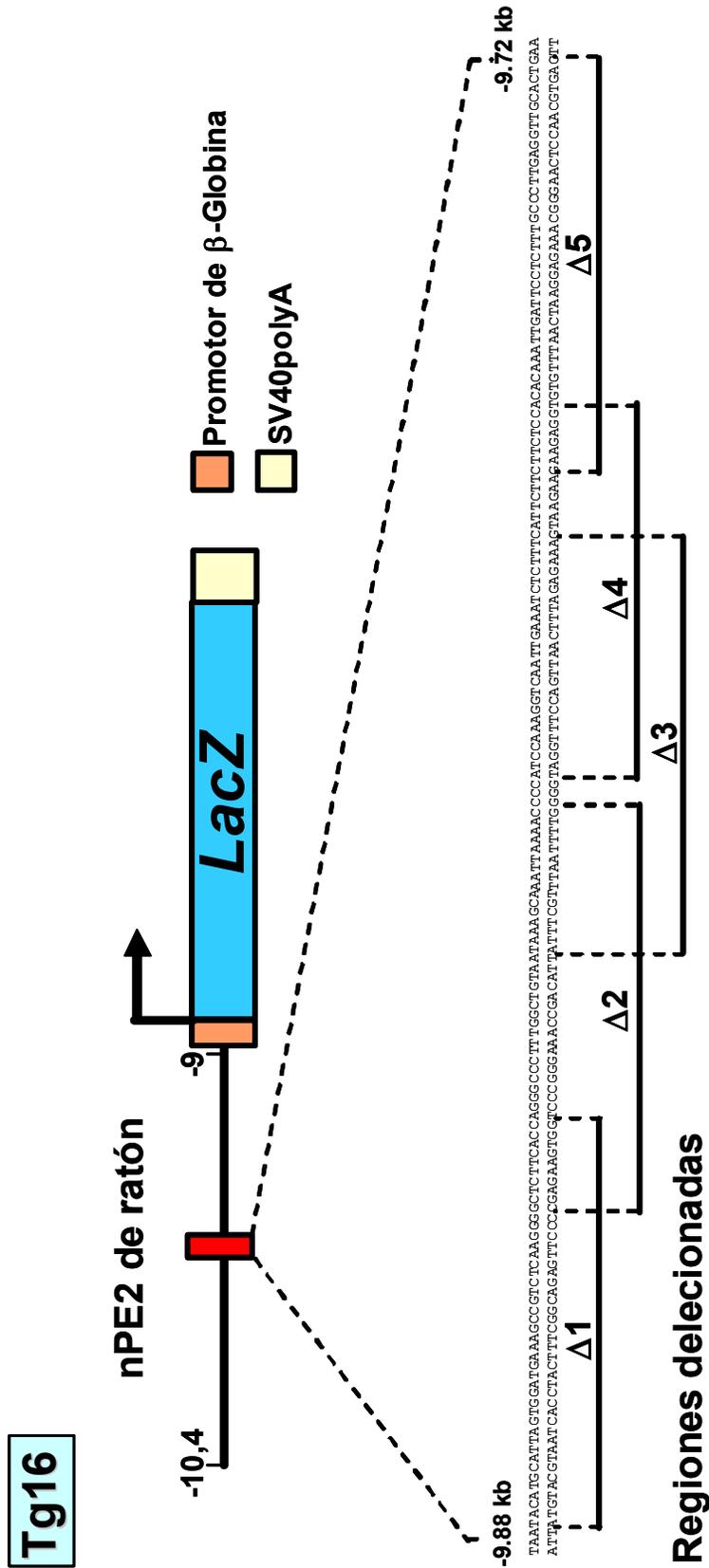


Figura 26: Esquema de las regiones deletionadas del enhancer nPE2. Los fragmentos con cada una de las deletiones fueron ligados río arriba del promotor de β -globina de pollo seguido del reportero LacZ

Cada uno de los fragmentos obtenidos con las deleciones fue clonado río arriba del promotor de β -globina de pollo seguido del gen reportero *LacZ* (Figura 27).

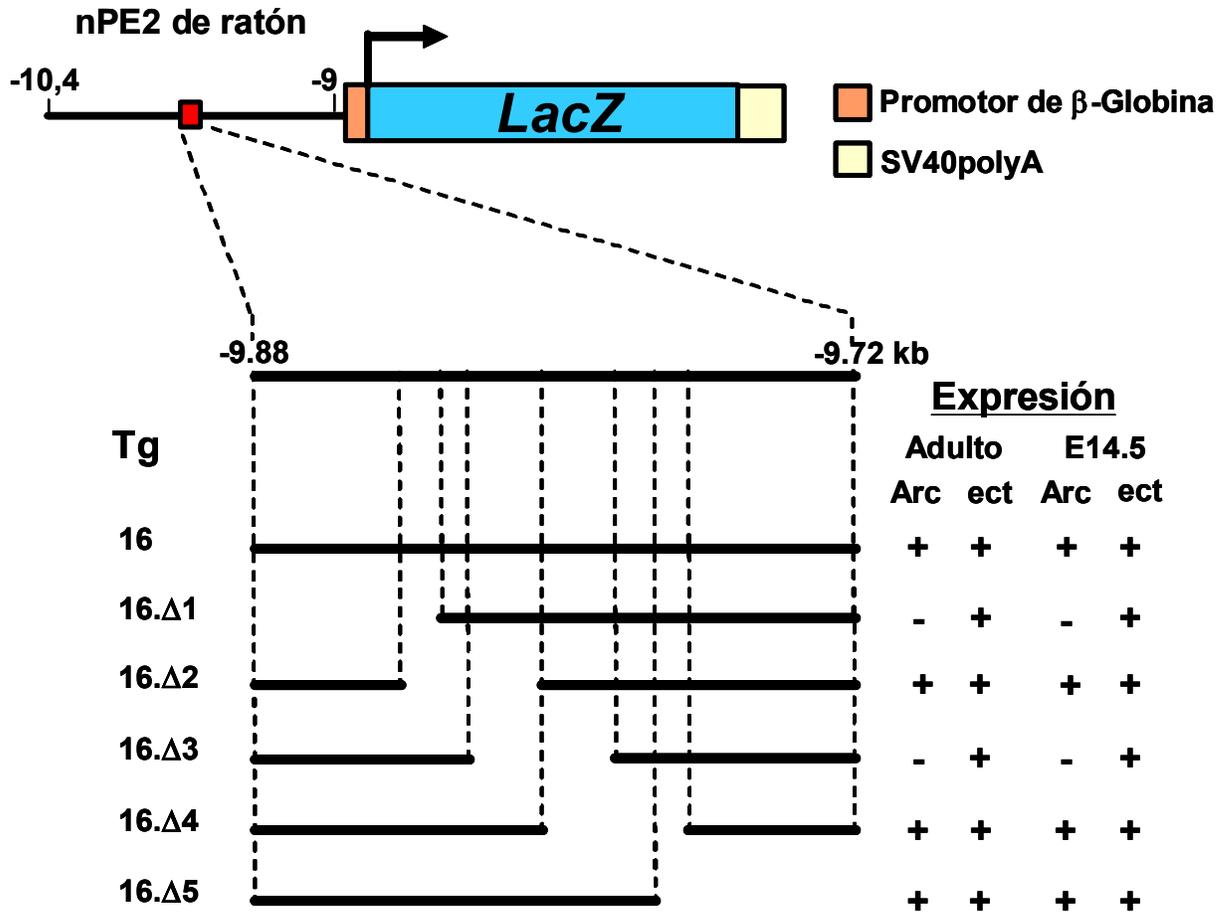


Figura 27: Esquema de los 5 transgenes con cada una de las deleciones superpuesta de 44 pb realizadas en nPE2. La expresión del reportero *LacZ* en las neuronas de POMC en el arcuato (Arc) o en regiones ectópicas (ect) de cerebros de ratones adultos o de embriones de E14.5 se indica con (+) y la ausencia con (-).

El patrón de expresión de los transgenes fue estudiado en animales adultos y en embriones de E14.5 de cada línea generada de la misma manera que con el transgén 16 (colocalización con tinción X-gal seguido de inmunohistoquímica para ACTH).. En la tabla de expresión de la figura 27 se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

Las regiones 5' y central de nPE2 son necesarias para la expresión de transgenes en neuronas de POMC del núcleo arcuato

Los ratones transgénicos portadores de la delección en la región 1 de nPE2 (Figura 27, transgén 16.Δ1) no lograron expresar *LacZ* en las neuronas del Arc en la totalidad de las 5 líneas analizadas (Figura 28 y tabla complementaria 2). Sólo una de las líneas mostró expresión ectópica en el Arc (detalle en figura 28B). Estos resultados indican que la región 1 de 44 pb ubicada en el extremo 5' de nPE2 contiene información necesaria para la expresión del reportero específicamente en neuronas hipotalámicas de POMC.

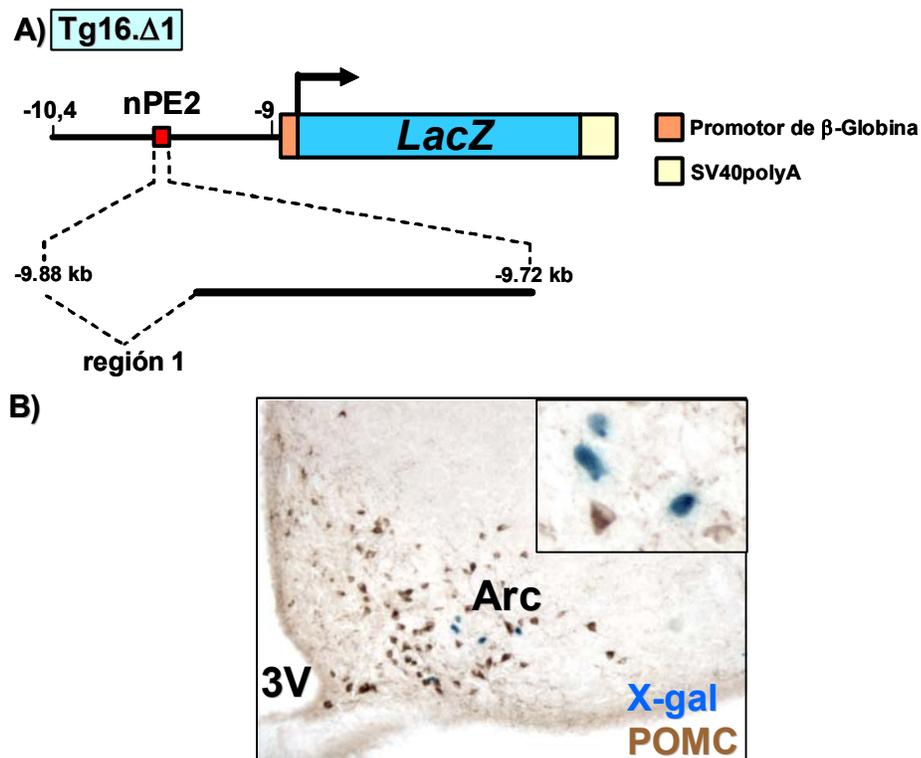


Figura 28: A) Esquema del transgén 16.Δ1. **B)** Colocalización entre la expresión del transgén (tinción con X-gal, celeste) y ACTH (inmunohistoquímica, marrón) de secciones de cerebro de ratón con el transgén 16.Δ1. El detalle muestra la expresión ectópica del transgén en el Arc a mayor aumento.

Por su parte, los transgenes con las delecciones en la zona central de nPE2, la región 2 y 4 (Figura 27, transgenes 16.Δ2 y 16.Δ4) mantuvieron la capacidad de

expresarse específicamente en las neuronas de POMC del Arc con un porcentaje de colocalización similar al transgén 16 sin deleciones (Figura 29 y tabla complementaria 2).

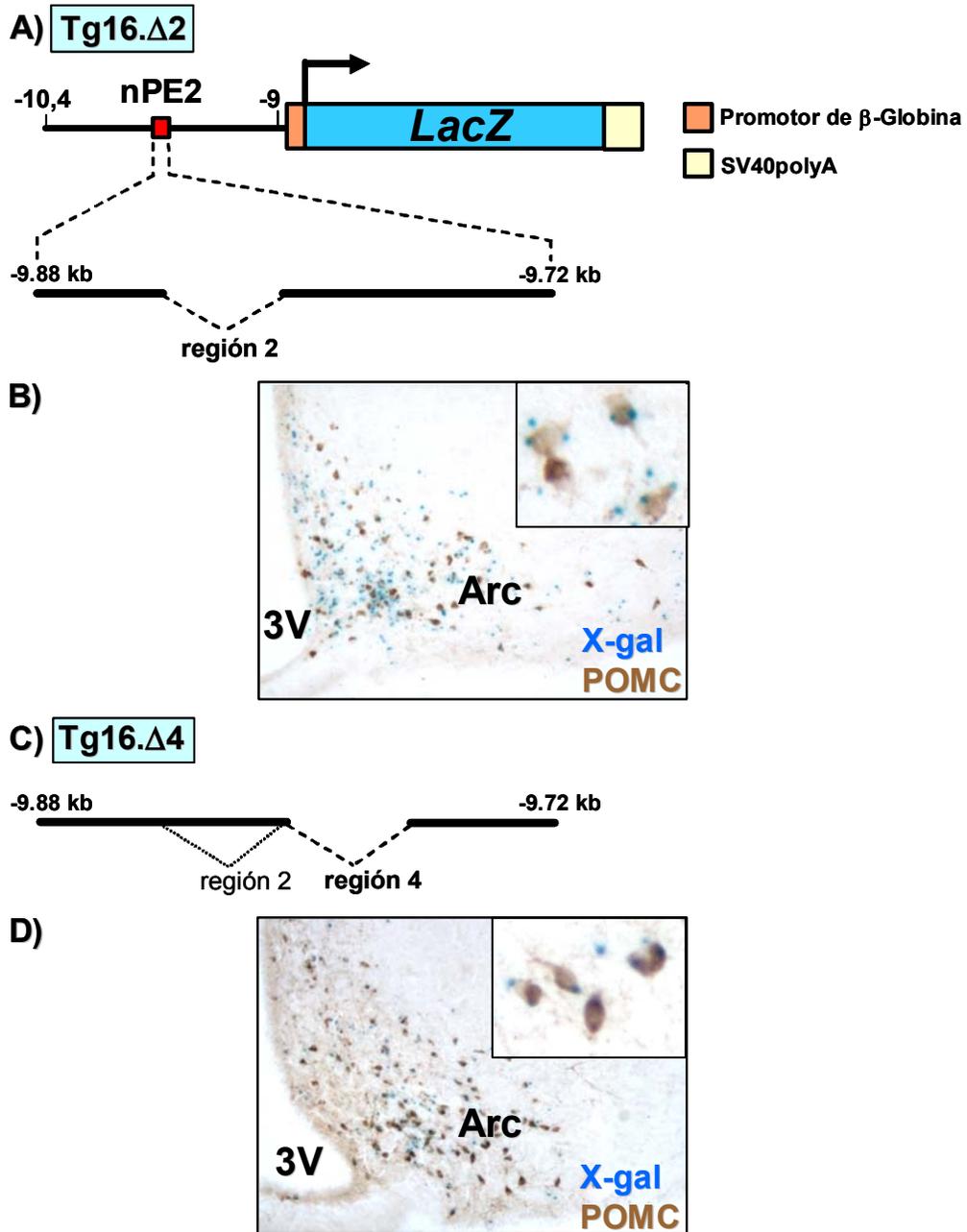


Figura 29: A) y C) Esquemas de los transgenes 16.Δ2 y 16.Δ4, respectivamente. B) y D) Colocalización entre la expresión del transgén (tinción con X-gal, celeste) y ACTH (inmunohistoquímica, marrón) de secciones coronales de cerebro de ratones con el transgén 16.Δ2 y 16.Δ4, respectivamente. Se muestran detalles de la colocalización a mayor aumento.

Sin embargo, la delección de la región 3, que incluye parte de las regiones 2 y 4 (Figura 27, transgén 16.Δ3) anuló la capacidad de nPE2 de dirigir la expresión transgénica a neuronas hipotalámicas de POMC (Figura 30 y tabla complementaria 2). Ninguna de las 6 líneas analizadas mostró expresión en el Arc y sólo una de ellas mostró expresión ectópica en la corteza cerebral (Figura 30B). Estos resultados demuestran que esta secuencia de 46 pb también es necesaria para la adecuada expresión del gen reportero en neuronas de POMC del Arc.

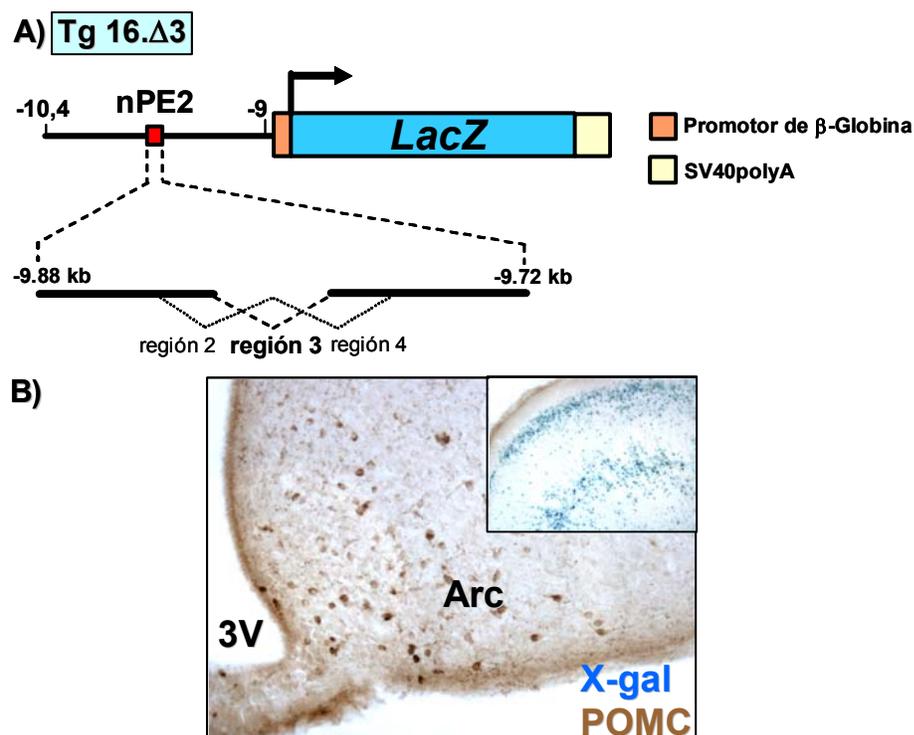


Figura 30: A) Esquema del transgén 16.Δ3. **B)** Colocalización entre la expresión del transgén (tinción con X-gal, celeste) y ACTH (immunohistoquímica, marrón) de secciones coronales de cerebro de ratón con el transgén 16.Δ3. El detalle muestra la expresión ectópica del transgén en la corteza cerebral.

El hecho de que las regiones 2 y 4 sean prescindibles para transactivar transgenes en neuronas de POMC y que la región 3 sea necesaria, sugiere que la porción 3' de la región 2 y la 5' de la región 4 tendrían secuencias críticas para el funcionamiento de nPE2 pero que serían mutuamente redundantes. Sólo cuando se eliminan simultáneamente (delección de la región 3) se inhibe su capacidad de

estimular la transactivación de transgenes. Posiblemente las secuencias:

AAAG----CAAATT--AAA presente en las regiones 2 y 3

AAAGGTCAA--TTGAAA presente en las regiones 3 y 4

tengan la capacidad de reclutar al mismo complejo de factores de transcripción.

Finalmente, la delección de la región 5 de nPE2 (Figura 27, transgén 16.Δ5) no afectó la expresión específica del reportero en las neuronas de POMC en el Arc (Figura 31) mostrando valores de colocalización similares a los de la construcción sin delecciones del transgén 16 (ver tabla complementaria 2). Estos resultados indican que la región 5 de nPE2 no es crítica para asegurar la expresión del transgén específicamente en las neuronas de POMC en el Arc del ratón adulto.

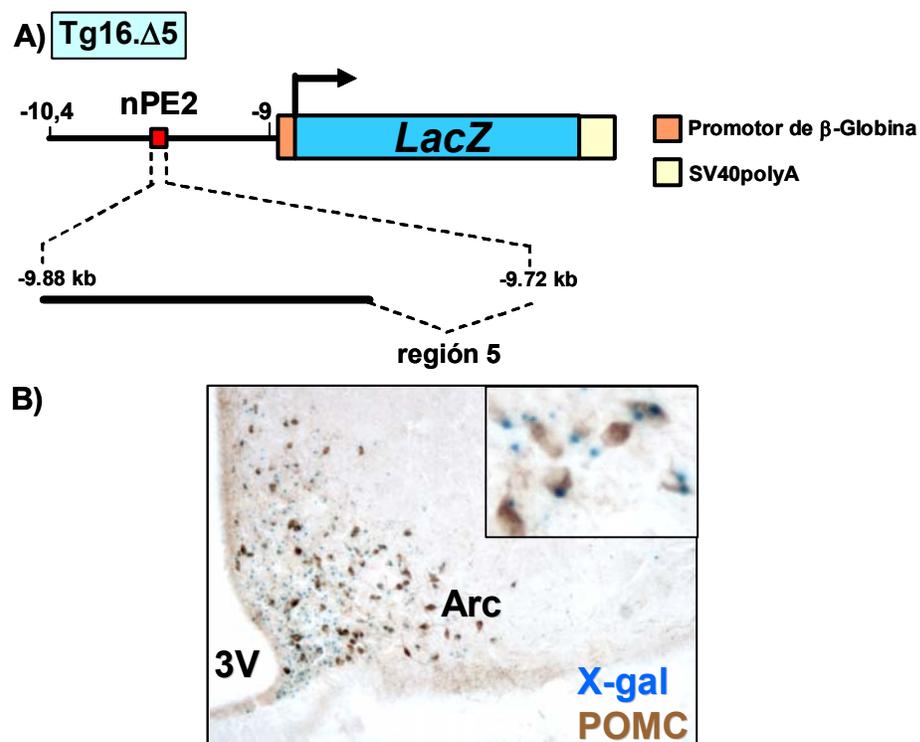


Figura 31: A) Esquema del transgén 16.Δ5. B) Colocalización entre la expresión del transgén (tinción con X-gal, celeste) y ACTH (inmunohistoquímica, marrón) de secciones coronales de cerebro de ratón con el transgén 16.Δ5. Se muestra un detalle de la colocalización a mayor aumento.

Rol de las distintas regiones de nPE2 durante el desarrollo embrionario

El *enhancer* nPE2 dirige la expresión de transgenes durante el desarrollo embrionario con el mismo patrón espacial y temporal que se expresa el gen endógeno *POMC*, en la base del diencéfalo que dará origen al hipotálamo adulto. Para estudiar la participación de las distintas regiones de nPE2 durante el desarrollo, se analizó el patrón de expresión de los transgenes con las distintas deleciones en embriones de E14.5 que ya expresan *POMC* en el hipotálamo embrionario y en corticotrofos y melanotrofos de la hipófisis. Los resultados fueron similares a los obtenidos con las distintas deleciones de nPE2 en el cerebro adulto (Figura 32).

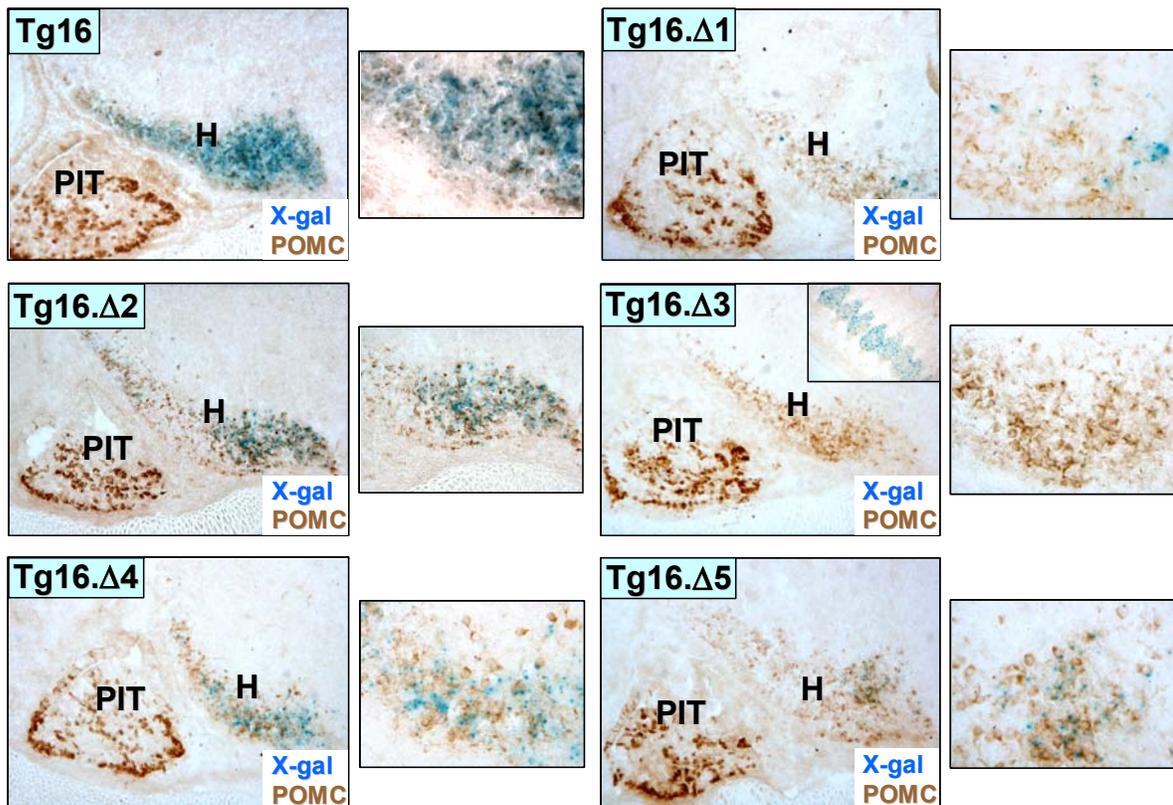


Figura 32: Análisis delecional de nPE2 en embriones. Colocalización entre la expresión del transgén (tinción con X-gal, celeste) y ACTH (inmunohistoquímica, marrón) en secciones sagitales de embriones de E14.5. Los paneles de la derecha muestran una ampliación del diencéfalo basal. En el Tg 16.Δ3 se muestra un detalle de la expresión ectópica en los somitos. H, hipotálamo embrionario. PIT, pituitaria.

Las líneas con las deleciones en las regiones 2, 4 y 5 (transgenes 16.Δ2, 16.Δ4 y 16.Δ5, respectivamente) mostraron un patrón de expresión transgénica en el hipotálamo embrionario similar al obtenido con el transgén 16 sin deleciones (Figura 32, transgenes 16.Δ2, 16.Δ4 y 16.Δ5). Las líneas con las deleciones de las regiones 1 y 3 (transgenes 16.Δ1 y 16.Δ3) no expresaron el transgén en el hipotálamo embrionario en embriones de E14.5 (Figura 34, transgenes 16.Δ1 y 16.Δ3).

Potenciales TFBS dentro del *enhancer* nPE2

Los experimentos presentados en este trabajo demuestran que nPE2 es un *enhancer* altamente específico para neuronas hipotalámicas de POMC y de gran penetrabilidad transcripcional (la mayoría de las líneas expresan el transgén). Posee dos regiones de 45 pb que son absolutamente necesarias para dirigir la expresión de genes reporteros a neuronas de POMC en el Arc.

El análisis de potenciales TFBS encontrados por el programa rVISTA, utilizando un parámetro con menor exigencia de similitud entre las matrices PWM del TRANSFAC y la secuencia analizada, se muestra en la figura 33. Puede observarse que hay una alta concentración de potenciales TFBS en la región 3 y 5 del *enhancer* nPE2 y menor cantidad de TFBS en la región 1. Entre los TFBS se encuentran Pax2 y PPARA en la región 3 y ACAAT y EBF en la región 1 (Figura 33). Pax 2 está involucrado en el desarrollo embrionario del sistema nervioso central, más específicamente en la función de organización y regionalización del límite di-mesencefálico (ver revisión en Nakamura y Watanabe, 2005). Los factores PPARAs constituyen una subfamilia de FT que juegan un importante rol en procesos metabólicos, específicamente, en la disponibilidad de glucosa y la distribución de lípidos (Kiec-Wilk *et al.*, 2005) y en la regulación de la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos (Nakamura y Nara, 2002).

El motivo ACAAT encontrado en la región 1 de nPE2 es reconocido por Sox30, un miembro recientemente caracterizado de la familia de FT Sox (Osaki *et al.*, 1999), involucrados en el desarrollo. Los FT de la familia EBFs están involucrados en el desarrollo de los huesos y su homeostasis (Kieslinger *et al.*, 2005).

Resulta interesante de marcar que un análisis con BLASTn de la secuencia completa de nPE2 contra el genoma completo de ratón muestra que las regiones 2, 4 y 5 se repiten en otras áreas del genoma (Figura 34). Por el contrario, las regiones 1 y 3, cuya funcionalidad fue demostrada experimentalmente, son únicas.

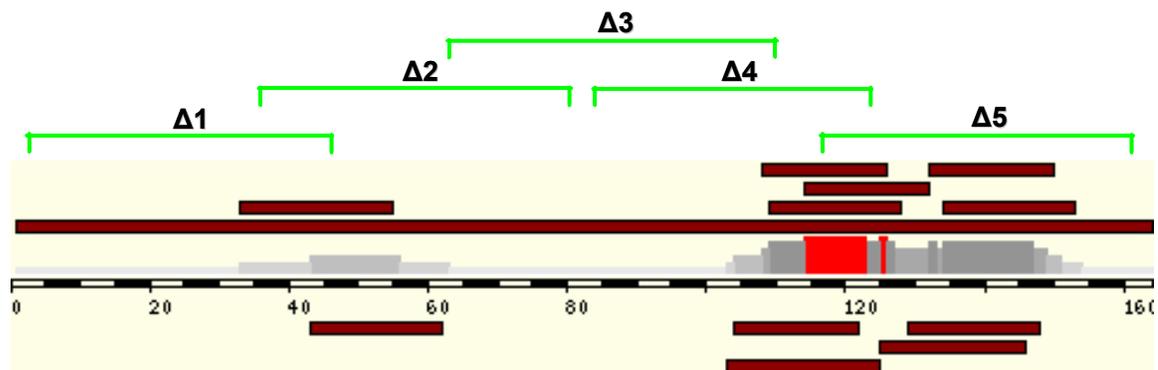


Figura 34: BLASTn realizado para comparar la secuencia de nPE2 (164 pb) con el genoma completo de ratón. La secuencia de nPE2 se muestra en la base en blanco y negro (divisiones cada 5 pb). Los *hits* encontrados en distintas partes del genoma se muestran como barras de color marrón. Sobre la secuencia se grafica la cantidad de *hits* encontrados. Arriba se señalan las regiones delecionadas en verde.

El análisis delecional de expresión en ratones transgénicos y los ensayos bioinformáticos presentados indican que las regiones 1 y 3 dentro del *enhancer* nPE2 constituyen secuencias regulatorias críticas para el control de la expresión del gen de *POMC* en las neuronas del Arc del hipotálamo. Especialmente la región 3: i) es funcionalmente crítica para dirigir la expresión de transgenes a neuronas de *POMC* en el Arc; ii) presenta un altísimo grado de conservación, la más alta dentro de nPE2 e incluso mayor que las secuencias del exón 3 que codifica para

los péptidos biológicamente activos de POMC; iii) concentra la mayor cantidad de potenciales TFBS y iv) posee una secuencia de 27 nt que tiene una identidad del 75 % con una secuencia presente en nPE1, otro *enhancer* neuronal de *POMC* con la capacidad por sí sólo de dirigir la expresión de transgenes al mismo grupo celular.

En conclusión, este trabajo comenzó con la identificación de 4 kb ubicadas en la región 5' flanqueante del gen de *POMC* de ratón (de -13 a -9) que resultaron necesarias para la expresión de transgenes en neuronas hipotalámicas de *POMC*. Mediante la combinación de estudios funcionales de expresión en ratones transgénicos y análisis bioinformáticos se logró acotar el tamaño de una secuencia imprescindible para la expresión de *POMC* en el cerebro a dos regiones de 45 pb. Este estudio permitió establecer las bases moleculares que actuando en cis controlan la expresión del gen de *POMC* en el cerebro y a su vez proporciona claves valiosas para la futura identificación de los FTs que las reconocen.

TABLAS COMPLEMENTARIAS

Tabla complementaria 1: Porcentaje de colocalización y expresión ectópica de los transgenes 13, 14 y 15 que llevan el reportero *LacZ* en cerebros de ratones adultos.

Transgén-línea	Colocalización Arc (%)	Expresión ectópica
13-4	95	habénula, amígdala, LH
13-5	68	nd
13-7	10	nd
13-9	(-)	(-)
13-19	(-)	(-)
13-22	(-)	(-)
14-4	62	corteza cerebral, habénula, amígdala, PH
15-21	>90	Muy baja, Arc (ectópica), LH, habénula, amígdala

(-) no se expresa.
nd no determinado.

Tabla complementaria 2: Porcentaje de colocalización y expresión ectópica de los transgenes de 16 y de 16.Δ1a 16.Δ5 que llevan el reportero *LacZ* en cerebros de ratones adultos.

Transgén-línea	Colocalización Arc (%)	Expresión ectópica
16-1	(-)	(-)
16-15	45	vasos, Arc, Pa, amígdala, cápsula interna, habénula
16-19	68	tronco encefálico, Arc
16-21	(-)	(-)
16-26	61	tronco encefálico, Pa, amígdala, habénula
Δ1-2	(-)	(-)
Δ1-9	(-)	(-)
Δ1-10	(-)	(-)
Δ1-12	(-)	Arc, cerebelo, tronco encefálico, IPR
Δ1-13	(-)	(-)
Δ2-14	(-)	(-)
Δ2-24	(-)	posterior comm
Δ2-27	(-)	(-)
Δ2-66	42	cerebelo, corteza cerebral, tronco encefálico
Δ2-71	80	Baja, Arc, corteza cerebral
Δ3-2	(-)	(-)
Δ3-8	(-)	(-)
Δ3-11	(-)	(-)
Δ3-21	(-)	(-)
Δ3-28	(-)	(-)
Δ3-31	(-)	cápsula interna, corteza, tronco encefálico, nervio óptico
Δ4-4	42	nd
Δ4-41	14	baja, Arc
Δ4-44	(-)	(-)
Δ4-51	72	cerebelo, tronco encefálico, algunos vasos
Δ4-74	14	nervio óptico, habénula, tronco encefálico
Δ5-1	32	cerebelo, tronco encefálico, Pn, corteza, AOB
Δ5-10	18	cerebelo, en todo el cerebro en general
Δ5-11	(-)	(-)
Δ5-12	<40	en todo el cerebro en general
Δ5-13	43	poco: tálamo, tronco encefálico
Δ5-14	(-)	(-)
Δ5-23	40	muy baja
Δ5-25	40	muy baja
Δ5-30	>90	muy baja en cerebelo y HPC
Δ5-44	(-)	(-)
Δ5-50	(-)	(-)
Δ5-52	>90%	cerebelo, estriado, tronco encefálico, Pn, habénula

(-) no se expresa.
nd no determinado.

Resumen de la Tabla complementaria 2: número de líneas que se expresan en neuronas de POMC en el Arc y número de líneas que expresan el transgén en regiones ectópicas. Transgenes de 16 y de 16.Δ1 a 16.Δ5.

transgén	Expresión Arc	Expresión ectópica
16	3/5	3/5
Δ1	0/5	1/5
Δ2	2/5	3/5
Δ3	0/6	1/6
Δ4	4/5	4/5
Δ5	8/12	8/12

CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos moleculares que controlan la expresión del gen de *POMC* en el hipotálamo. En ausencia de líneas celulares neuronales que expresen *POMC*, se realizó un análisis delecional en ratones transgénicos los cuales proporcionan un sistema de expresión altamente eficiente para estudiar la capacidad de diferentes regiones genómicas de dirigir la expresión de genes reporteros simultáneamente en todos los tipos celulares y durante distintos estadios del desarrollo.

Se identificaron y caracterizaron dos *enhancers* distales, nPE1 y nPE2, y se demostró que juegan un rol esencial en la activación de la expresión del gen de *POMC* en una población definida de neuronas hipotalámicas del núcleo arcuato. Además, se determinaron dos regiones dentro del elemento nPE2 que son críticas para su función *enhancer* en el ratón adulto y durante el desarrollo embrionario. La utilización de herramientas computacionales bioinformáticas permitió determinar el grado de conservación de estos *enhancers* y se encontraron potenciales sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) conservados y alineados dentro de sus secuencias.

Los resultados más importantes de esta Tesis Doctoral indican que:

- i) una región genómica distal que contiene nPE1 y nPE2 es necesaria y suficiente para dirigir la expresión específica de genes reporteros a neuronas de *POMC* en el arcuato;
- ii) tanto nPE1 como nPE2 aseguran una apropiada expresión de genes reporteros en neuronas de *POMC* en el arcuato, mientras que la eliminación simultánea de estos dos *enhancers* impide completamente la expresión neuronal de transgenes;
- iii) la expresión de *POMC* en el cerebro y en la glándula pituitaria está controlada por grupos de *enhancers* diferentes e independientes;

- iv) las secuencias nucleotídicas y la organización genómica de nPE1 y nPE2 están altamente conservadas entre mamíferos pero no entre los mamíferos y aves, anfibios o peces;
- v) la actividad *enhancer* de los fragmentos genómicos de ratón y humano que contienen nPE1 y nPE2 está funcionalmente conservada;
- vi) un número limitado de potenciales sitios de unión para factores de transcripción alineados y conservados están presentes en ambos *enhancers* nPE1 y nPE2.
- vii) el *enhancer* nPE1 no está conservado en mamíferos no placentarios, mientras que nPE2 se encuentra altamente conservado entre toda la clase Mamalia;
- viii) el *enhancer* nPE2 es capaz de dirigir una adecuada expresión de transgenes a neuronas de POMC en forma independiente del *enhancer* nPE1;
- ix) nPE2 determina durante el desarrollo un patrón de expresión temporal y espacial que mimetiza al del gen endógeno *POMC*;
- x) dos regiones de aproximadamente 45 pb dentro del *enhancer* nPE2, ubicadas en la porción 5' y central, son críticas para la expresión de *POMC* en las neuronas del arcuato en el ratón adulto y en el embrión;
- xi) la región central crítica de nPE2 es única en todo el genoma de ratón, es la porción más altamente conservada entre los mamíferos y presenta una alta concentración para TFBS.

Identificación de dos *enhancers* neuronales que controlan la expresión del gen de *POMC* en el SNC

En el núcleo arcuato del hipotálamo de ratón aproximadamente 3.000 neuronas que expresan *POMC* coexisten con neuronas que expresan otros neuropéptidos o monoaminas, incluyendo NPY/AGRP, grelina, somatostatina y dopamina (Cowley *et al.*, 2001; Cowley *et al.*, 2003; Saper *et al.*, 2002). El conjunto específico de neuropéptidos que se expresa en cada una de estas subpoblaciones neuronales está determinado probablemente por la combinación particular de factores de

transcripción que actúan durante la ontogénesis y consecuentemente en el mantenimiento de los fenotipos establecidos. Los *enhancers* nPEs probablemente jueguen un rol importante en estos procesos, actuando como sitios de reconocimiento para el ensamblado del complejo transcripcional que participa en el remodelado de la estructura de la cromatina en el *locus* de *POMC* y su expresión en las neuronas del núcleo arcuato.

A pesar de que se demostró que las regiones humana y de ratón que contienen nPE1 y nPE2 son necesarias y suficientes para dirigir la expresión de genes reporteros a neuronas de POMC en el arcuato de ratones transgénicos, no fueron capaces de aislar a los transgenes de las influencias transcripcionales presentes en el sitio de inserción. En consecuencia, la mayoría de las líneas de transgénicos que mostraron expresión del reportero en neuronas de POMC en el arcuato también tuvieron un patrón variable de expresión ectópica del transgén.

Resulta interesante que el análisis delecional en ratones transgénicos demostró que nPE1 y nPE2 no necesitan estar simultáneamente presentes para dirigir la expresión de los transgenes a las neuronas de POMC en el arcuato, sugiriendo algún nivel de redundancia funcional entre estos dos *enhancers*. De todas maneras, es posible que cada *enhancer* nPE juegue un rol único en la regulación de la transcripción del gen de *POMC*. Por ejemplo, los receptores de leptina localizados en las neuronas de POMC en el arcuato señalizan a través de STAT3 fosforilado y un déficit en esta vía de transducción de señales dentro de estas neuronas correlaciona con niveles bajos de ARNm de *POMC* (Bates *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004). Un estudio reciente realizado *in vitro* usando una línea celular heteróloga mostró que STAT3 podría activar la transcripción de *POMC* a través de la interacción con un sitio de unión para STAT3 no canónico localizado inmediatamente río arriba de la TATAA box (Munzberg *et al.*, 2003). Aunque todavía no se sabe si la fosforilación de STAT3 activa directamente la expresión de *POMC*, nPE1 contiene un sitio canónico para STAT3 que está conservado y alineado entre los mamíferos y podría participar en la expresión de *POMC*

regulada por leptina. Son necesarios más estudios para investigar esta posibilidad.

Otra posibilidad es que nPE1 y nPE2 jueguen un rol diferente en la determinación de la expresión de POMC en otras áreas del SNC, por ejemplo en el núcleo del tracto solitario (NTS). En todas las líneas se observó expresión ectópica de los reporteros en varios núcleos del tronco encefálico, incluyendo el NTS. Sin embargo, fue técnicamente imposible en nuestro laboratorio y otros lograr detectar en este núcleo la proteína endógena POMC a través de inmunohistoquímica o su ARNm a través de una hibridación *in situ* para poder estudiar el grado de colocación con la expresión del reportero. Incluso las líneas con la delección simultánea en ambos nPEs mostraron expresión ectópica en los diferentes núcleos del tronco encefálico, complicando el análisis de la participación de estos *enhancers* en la expresión de *POMC* en el NTS. En resumen, es probable que nPE1 y nPE2 cumplan diferentes roles en la regulación de la expresión del gen de *POMC* ya sea determinando su expresión en diferentes tejidos (NTS y Arc por ejemplo), cumpliendo distintas funciones durante el desarrollo ontogénico o determinando diferentes funciones de regulación hormonal del gen en distintos estados fisiológicos.

Arquitectura modular del gen de *POMC*

En este trabajo se demostró que los fragmentos genómicos de ratón y humano que contienen nPE1 y nPE2 fusionados a promotores mínimos heterólogos dirigen la expresión de transgenes a neuronas hipotálamicas de POMC en ausencia de expresión detectable del reportero en los melanotrofos y corticotrofos de la pituitaria (transgenes 5, 10, 11 y 13-16). Por otro lado, la eliminación simultánea de nPE1 y nPE2 en el contexto de la unidad transcripcional entera del gen de *POMC* junto con regiones flanqueantes, impide la expresión del reportero en el núcleo arcuato mientras que mantiene la expresión del transgén en células de POMC en la pituitaria (transgén 9). El conjunto de estos resultados indica que dos grupos independientes de *enhancers* separados por unas 10 kb controlan la expresión celular específica de *POMC*: un modulo distal participa en la

transcripción de *POMC* en el cerebro y un modulo proximal actúa en la pituitaria. Todavía queda por investigar si estas dos regiones modulares interactúan bajo ciertas circunstancias fisiológicas para regular la expresión de *POMC* en la pituitaria o en el cerebro.

La arquitectura modular independiente del gen de *POMC* podría tener también implicaciones importantes en el estudio de la predisposición genética a la obesidad familiar. La deficiencia total de *POMC* causa un síndrome complejo que incluye insuficiencia adrenal, alteración de la pigmentación de la piel y el pelo y obesidad severa de aparición temprana debido probablemente a la falta de ACTH y melanocortinas periféricas y centrales, respectivamente (Challis *et al.*, 2004; Krude *et al.*, 1998; Yaswen *et al.*, 1999). Si bien mutaciones nulas de *POMC* son extremadamente raras en humanos, un rastreo genómico de QTL demostró un ligamiento genético entre características relacionadas con obesidad y una región del cromosoma 2 humano que contiene el *locus* de *POMC* con un *LOD score* de 7.5, el más alto encontrado en estudios genéticos humanos de características relacionadas con obesidad (revisión en Comuzzie, 2000). Este ligamiento fue determinado primeramente en una población de estadounidenses de origen mexicano y confirmado en otros estudios llevados a cabo en franceses caucásicos y estadounidenses negros (Hager *et al.*, 1998; Hixson *et al.*, 1999; Rotimi *et al.*, 1999). Aunque el gen candidato más fuerte para este QTL en el cromosoma 2 es *POMC*, no se encontró ninguna mutación de pérdida de función dentro de la unidad transcripcional de *POMC* ni en el promotor proximal (Hixson *et al.*, 1999). Por lo tanto, es tentador especular acerca de la posibilidad de que polimorfismos o mutaciones en nPE1 y nPE2 puedan disminuir la tasa de transcripción de *POMC* en el cerebro y en consecuencia el contenido neuronal de los péptidos de *POMC*, alterando el mecanismo central de homeostasis energética y predisponiendo a una excesiva ganancia de peso sin alterar los niveles o las acciones fisiológicas de los productos de *POMC* de la pituitaria. Las regiones nPEs son candidatos naturales a ser examinados para detectar secuencias polimórficas que puedan influir sobre la conducta alimentaria y la predisposición a la obesidad en humanos.

Footprinting filogenético para identificar los *enhancers* neuronales de *POMC*

Hasta hace muy poco tiempo resultaba prácticamente imposible predecir la localización de elementos regulatorios transcripcionales presentes en regiones intergénicas basándose solamente en el análisis de la secuencia nucleotídica. Sin embargo, la creciente disponibilidad de secuencias genómicas de un vasto número de especies de vertebrados ha permitido la identificación de regiones regulatorias a través de la comparación de regiones intergénicas homólogas de diferentes especies, una técnica llamada *phylogenetic footprinting* (Fickett y Wasserman, 2000; Loots *et al.*, 2000; Thomas y Touchman, 2002). Esta estrategia está basada en la idea de que como resultado de la presión de selección, las mutaciones se acumulan más rápidamente en residuos nucleotídicos no funcionales mientras que los residuos funcionales permanecen más conservados. Por lo tanto, alineamientos múltiples entre *loci* de genes ortólogos permite el descubrimiento de potenciales secuencias regulatorias embebidas dentro de amplias regiones intergénicas no conservadas. En este trabajo, la combinación de *footprinting* filogenético con un análisis de expresión en ratones transgénicos nos permitió identificar dos *enhancers* neuronales de *POMC* a quienes denominamos nPE1 y nPE2. Estos dos *enhancers* están presentes en especies representativas de los órdenes de mamíferos Rodentia, Primates, Carnivora y Artiodactyla. En mamíferos no placentarios tales como el monotremado *O. anatinus* y el marsupial *M. domestica* solo se encontró nPE2 por lo que nPE1 sería una adquisición exclusiva de mamíferos placentarios que podría haberse originado por una duplicación de nPE2. Contrariamente, no se pudieron detectar secuencias conservadas con los *enhancers* nPEs en vertebrados no mamíferos, a pesar de que *POMC* se expresa en el hipotálamo ventromedial de la gallina y peces teleosteos (Cerdeira-Reverter *et al.*, 2003; Gerets *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003; Tollemer *et al.*, 1999). Aún cuando hay muchos ejemplos de *enhancers* conservados entre mamíferos, aves y peces (Bagheri-Fam *et al.*, 2001; Brenner *et al.*, 2002; Gottgens *et al.*, 2000; Rowitch *et al.*, 1998; Uchikawa *et al.*, 2003) las únicas regiones conservadas que observamos después de la comparación del

locus humano de *POMC* con secuencias genómicas ortólogas de otros vertebrados no mamíferos fueron los exones 2 y 3. De todas maneras, dado que la expresión hipotalámica de *POMC* está conservada entre los vertebrados y que el *core* de reconocimiento de los TFBS son generalmente muy cortos (entre 6 y 10 bp) y admiten cierto grado de degeneración es posible que un conjunto similar de FTs controle la expresión de *POMC* en todos los vertebrados, aunque la acumulación de mutaciones neutrales a través de la evolución impida a los programas bioinformáticos actuales identificar por ahora a los *enhancers* neuronales de *POMC* de vertebrados no mamíferos.

El ejemplo de *POMC* ilustra el hecho de que para cada gen un grupo diferente de especies proporciona resultados útiles en el análisis de *footprinting* filogenético. En este caso, la comparación humano vs ratón provee un grado óptimo de conservación de secuencia para la identificación de *enhancers* funcionales mientras que el par humano vs chimpancé resulta demasiado similar y la secuencias de aves, anfibios o peces demasiado diferente.

Rol de los nPEs en el desarrollo embrionario

La expresión temprana de *POMC* y el rápido establecimiento de vías de conexión a lo largo de todo el cerebro del embrión (Elkabetz *et al.*, 1989) sugiere un importante rol para *POMC* durante el desarrollo del SNC. *POMC* comienza a expresarse muy tempranamente durante el desarrollo en el día E10.5 en el diencefalo basal (Japon *et al.*, 1994). Sin embargo, los mutantes deficientes en β -endorfina (Rubinstein *et al.*, 1993a) y los ratones deficientes en los receptores de melanocortinas MC3-R y MC4-R (Feng *et al.*, 2000; Huszar *et al.*, 1997) no mostraron ninguna anomalía durante el desarrollo. Los ratones con mutaciones nulas de *POMC* (Yaswen *et al.*, 1999) en cambio, no siguen una distribución mendeliana, indicando una letalidad pre o perinatal con penetrancia incompleta. En el animal adulto, la expresión de *POMC* en el núcleo arcuato está involucrada con el balance energético y la respuesta al estrés. Durante la embriogénesis, no es necesario un mecanismo que promueva saciedad y gasto energético dado que

el embrión requiere de energía constante para su desarrollo. Por lo tanto, POMC podría estar involucrado en la respuesta al estrés en la etapa embrionaria. Aunque no podemos descartar algún rol en la diferenciación y proliferación de los distintos tipos celulares del hipotálamo. Es necesaria mayor investigación de este tema para determinar el papel de POMC durante el desarrollo.

El *enhancer* nPE2 es capaz de dirigir un patrón de expresión temporal y espacial del transgén que es idéntico al del gen de *POMC* durante el desarrollo en el diencéfalo basal, comenzando al día E10.5. No se observó ninguna expresión ectópica en la pituitaria en desarrollo en ninguna de las líneas analizadas. Sin embargo, sí se observó expresión ectópica en los somitos y en la retina en todas las líneas estudiadas incluyendo las líneas que portaban las delecciones seriadas en nPE2 (transgenes 16.Δ1- 16.Δ5). Esto demuestra que el *enhancer* nPE2 si bien es suficiente para dirigir la expresión de *POMC* durante el desarrollo al diencéfalo basal, no es capaz de reprimir la expresión en otros tejidos. Por lo tanto, otras secuencias son necesarias para restringir la expresión del gen exclusivamente a las neuronas que expresan *POMC*. Dado que el transgén parental 1 también mostró el mismo patrón de expresión ectópica en el embrión, es posible que las secuencias faltantes sean regiones regulatorias que se encuentren más allá de las 22 kb analizadas y que estén involucradas en la regulación de la transcripción a nivel del ensamblado y remodelado de la cromatina.

A diferencia de nPE2, en un trabajo similar al nuestro, se identificó un elemento represor dentro de un *enhancer* capaz de controlar la expresión ectópica del gen estudiado. Un análisis delecional en ratones transgénicos permitió encontrar un *enhancer* de 500 pb en el intron 6 del gen de *Ad4BP/SF-1* que dirige la expresión al hipotálamo ventromedial (Shima *et al.*, 2005). Este *enhancer* está altamente conservado entre humano, ratón y gallina y es capaz de reproducir la expresión del gen desde el diencéfalo ventromedial del embrión hasta el hipotálamo ventromedial del animal adulto. Dentro del *enhancer* se encontraron dos elementos uno activador y otro represor de la transcripción. Mutaciones en el

elemento represor inducen expresión ectópica en el área dorsal y en la zona ventricular del hipotálamo de manera específica.

El análisis delecional del *enhancer* nPE2 demostró que las regiones 1 y 3 son necesarias para la expresión de *POMC* en las neuronas del arcuato del ratón adulto y el diencefalo basal en el estadio E14.5 durante el desarrollo embrionario. Estadios más tempranos que éste no fueron analizados en todas las líneas, por lo que no podemos descartar la posibilidad de que alguna de estas regiones juegue algún rol importante para la expresión de *POMC* en estadios más tempranos del desarrollo.

Con respecto al rol del *enhancer* nPE1 en la expresión de *POMC* durante el desarrollo, se demostró que nPE1 es también capaz de dirigir la expresión temprana (E11.5) de transgenes al diencefalo basal del embrión. Sin embargo, son necesarios experimentos más detallados para estudiar el rol de nPE1 en otros estadios embrionarios.

Análisis delecional de nPE2

El análisis delecional dentro de nPE2 permitió la identificación de dos secuencias que son absolutamente necesarias para permitir a este *enhancer* dirigir la expresión de transgenes a neuronas de *POMC* del núcleo arcuato, tanto en el adulto como en el embrión: la región 1 en el extremo 5' y la región 3 en la zona central de nPE2. Estas dos regiones son exclusivas del *enhancer* nPE2 y no se encuentran repetidas en otras partes del genoma, como lo demostró el análisis de comparación con BLASTn (Figura 34). Ambas regiones del *enhancer* deben estar presentes para asegurar la expresión en neuronas de *POMC* en el núcleo arcuato. Resulta muy interesante el hecho de que es posible eliminar parte de la región 3, ya sea su porción 3' a través de la deleción de la región 2 o su porción 5' a través de la deleción de la región 4, sin afectar la capacidad funcional del *enhancer* en dirigir la expresión neuronal de *POMC*.

Como se demostró a través del alineamiento múltiple global nPE2 está altamente conservado entre un conjunto representativo de mamíferos. Se observaron dos secuencias consecutivas que son idénticas en todas las especies de mamíferos analizadas (Figura 21). Estas regiones están dentro de la región 3, cuya eliminación incapacita al *enhancer* para dirigir la expresión del transgén a las neuronas de POMC en el arcuato. Dada la alta conservación de estas dos secuencias y los resultados obtenidos del análisis delecional en ratones transgénicos es posible afirmar que dichas secuencias albergan sitios de unión para factores de transcripción necesarios para la expresión neuronal específica del gen de *POMC*. En concordancia con estos resultados, el programa rVISTA fue capaz de detectar una alta concentración de TFBS potenciales en estas dos secuencias. Sin embargo, la deleción parcial de la mitad 5' o de la 3' en los transgenes 16.Δ2 y 16.Δ4, respectivamente, no inhibe la funcionalidad del *enhancer*. Es posible que estas dos secuencias de la región 3 estén siendo reconocidos por FTs similares y que al menos uno de ellas deba estar presente para que el *enhancer* sea capaz de activar la transcripción en neuronas de POMC en el arcuato.

El alineamiento global múltiple mostró un menor grado de conservación de la región 1 del nPE2 entre las especies de mamíferos estudiadas. Además, el rVISTA no detectó una alta concentración de TFBS en esta región. Sin embargo, el análisis delecional reveló que esta región es necesaria para la expresión de los transgenes en neuronas hipotalámicas de POMC.

TFBS en nPE1 y nPE2

Los FT que controlan la expresión de POMC en el cerebro se desconocen totalmente. La identificación en este trabajo de nPE1 y nPE2 provee una plataforma valiosa para poder descubrir tales factores. La redundancia funcional que parece existir entre estos dos *enhancers*, sugiere varios mecanismos posibles a través de los cuales tanto nPE1 como nPE2 pueden asegurar la expresión neuronal de POMC: que ambos sean reconocidos por la misma combinación de

FTs; que sean reconocidos por distintas combinaciones de FTs o que sólo compartan algunos FTs. Un análisis computacional con el programa rVISTA (Loots y Ovcharenko, 2004), que reduce ampliamente el porcentaje de falsos positivos basándose en el *footprinting* filogenético, permitió encontrar algunos TFBS conservados en nPE1 y nPE2 cuya funcionalidad debe aun ser probada experimentalmente. Es posible también que existan TFBS menos conservados que sean funcionales, pero no puedan ser detectados por este programa que prioriza la alta conservación entre las secuencias analizadas y no considera que los FTs se unen a motivos cortos de secuencias (de 6 a 12 pb) que ocurren muy frecuentemente en el genoma y que las secuencias de reconocimiento de los FTs admiten un nivel considerable de degeneración.

El alto grado de presión de selección por la que atravesaron nPE1 y nPE2 durante más de 80 millones de años de distancia evolutiva entre Primates y Roedores sugiere que los TFBS conservados en estos *enhancers* juegan un rol clave en la determinación del linaje de células de POMC hipotalámicas, su expresión neuronal específica y la expresión regulada por hormonas de POMC en el cerebro. Esta hipótesis es consistente con el hecho de que las secuencias humanas de nPE1 y nPE2 son reconocidas por FTs de ratón para producir la expresión de reporteros en animales transgénicos (transgenes 13-15).

Los resultados obtenidos del análisis delecional en el *enhancer* nPE2 permiten especular acerca de los potenciales TFBS candidatos a ser funcionales. Dentro de la región 3 de nPE2, que es necesaria para la función *enhancer* de este elemento, se encuentra un sitio de unión para proteínas con homeodominio de la familia Nkx (Nkx6.1) cuyo *core* es TAAT en sentido *antisense*. En nPE1 se encuentra también este motivo (en sentido *sense* ATTA) dentro de una región altamente conservada entre mamíferos donde se encuentra el sitio para Brn4.0 (figura 20). Ambos motivos presentan un alto *score* de similitud con las matrices de peso de la base TRANSFAC de acuerdo al programa MatInspector (0.96 para Brn4.0 y 0.97 para Nkx6.1). Esta secuencia constituye un fuerte candidato para TFBS funcionales.

Otro TFBS posible es el de COUP/HNF4 dado que se encuentra dentro de la importante región 3 del nPE2. En conjunto, es posible especular que algunos de estos TFBS altamente conservados y alineados constituyen la plataforma donde actúan los FTs presente en las neuronas de POMC hipotalámicas. Serán necesarios ensayos funcionales y bioquímicas adicionales para identificar y caracterizar los FTs que controlan la expresión neuronal de *POMC*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de los transgenes

Los transgenes fueron construidos usando técnicas estándar de clonado molecular y el vector pBluescript SK (+/-) (Stratagene).

Transgén 1

Para construir el transgén parental 1 se insertó la región codificante de la proteína verde fluorescente (pEGFP-1, Clontech) seguido del sitio de poliadenilación del virus SV40 en un sitio *Stu* I ubicado antes del codón de iniciación del exón 2 del gen de POMC de ratón y a través de subclonados subsiguientes se extendieron las regiones flanqueantes de -13 a +8 kb del gen de *POMC* de ratón (Cowley *et al.*, 2001; Rubinstein y Cerdán, resultados no publicados) (Figura 35).

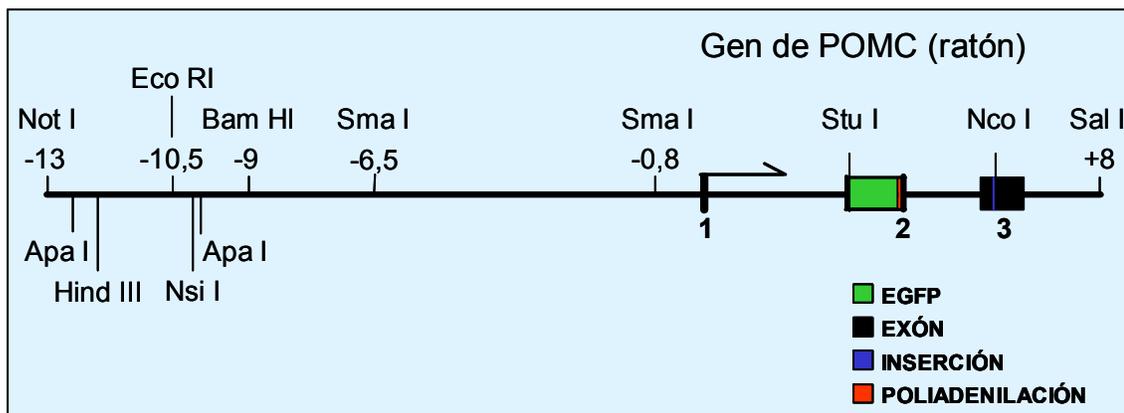


Figura 35: Esquema del transgén 1 parental. Se detallan los sitios de restricción utilizados para la construcción de los transgenes 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9. Los exones están numerados. La inserción consiste en un nucleótido heterólogo 30-mer. Existe un sitio de poliadenilación en el exón 2 río abajo del codón de terminación de EGFP.

Transgenes 2, 3, 4 y 6

Basados en esta construcción parental se construyeron los transgenes 2, 3, 4 y 6 produciendo deleciones con enzimas de restricción *Sma* I, *Bam* HI- *Sma* I, *Not* I- *Bam* HI y *Not* I- *Eco* RI, respectivamente (Figura 35).

Transgenes 7, 8 y 9

Los transgenes 7, 8 y 9 llevan deleciones del enhancer neuronal POMC 1 (nPE1) y nPE2 las cuales se realizaron usando las enzimas Apa I- Hind III (delección de 585 pb) y Nsi I- Apa I (delección de 172 pb), respectivamente (Figura 35).

Transgenes 5, 10, 11 y 12

Para construir los transgenes 5, 10, 11 y 12 se escindió del plásmido pTKGH (Nichols Institute) un fragmento de 2,4 kb que contenía el promotor mínimo del gen de la timidina kinasa (TK) del virus *Herpes simplex* río arriba del gen de la hormona de crecimiento humana (hGH) y se lo clonó río abajo del fragmento -13/-9 kb del gen de *POMC* de ratón (transgén 5), -13/-9 kb con delección de nPE1 (transgén 10), -13/-9 kb con delección de nPE2 (transgén 11) o -13/-9 kb con delección de ambos nPEs (transgén 12) de plásmidos previamente construidos.

Transgenes 13, 14 y 15

Para la construcción del transgén 13 dos fragmentos de DNA humano que contenían nPE1 y nPE2 (Figura 36) fueron amplificados por PCR usando los siguientes primers:

HP1: 5'-TTT GAA TTC CTG ACC TCA AGC GAT CCA CCC-3'

HP2: 5'-CTA GGC TCA GAT CTA GAG TCA AGC TCT GTG-3'

Estos primers amplifican un fragmento de 1,6 kb que contiene a nPE1.

HP3: 5'-GAC TCT AGA TCT GAG CCT AGA ATC ATA GAA-3'

HP4: 5'-CCC GAT ATC TCT GCA GGC ATC TGG ACC TC-3'

Estos primers amplifican un fragmento de 1,2 kb que contiene a nPE2.

Se utilizó como molde el BAC RP11 509E16 cuyo inserto de 180 kb contiene al gen de *POMC* humano completo. Ambos fragmentos fueron ligados a través de un sitio *Xba* I natural (subrayado en la secuencia) y subclonado en el vector pTrap (Pfeffer *et al.*, 2000). La calidad de la secuencia fue confirmada por secuenciación automática por PCR.

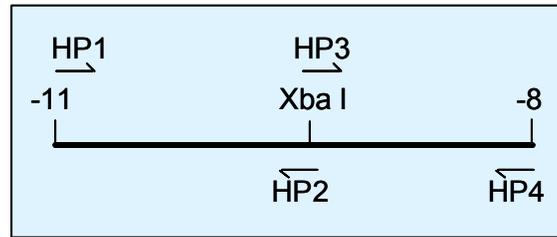


Figura 36: Esquema de amplificación de la región entre -11 y -8 kb río arriba del gen de *POMC* humano para la construcción de los transgenes 13, 14 y 15.

Para la construcción de los transgenes 14 y 15 se clonaron cada uno de los fragmentos ampliados por PCR antes mencionados de 1,6 y 1,2 kb conteniendo a nPE1 y nPE2 respectivamente, río arriba del promotor de β -globina de pollo seguido del gen de β -galactosidasa del plásmido pTRAP.

Transgenes 16, 16. Δ 1, 16. Δ 2, 16. Δ 3, 16. Δ 4, 16. Δ 5

Para la construcción de la serie de transgenes para el análisis delecional de nPE2 se utilizó un sistema de deleción por PCR con megaprimers (Figura 37). El sistema consiste en un par de primers externos 1 y 2 que amplifican un fragmento de aproximadamente 1,4 kb que va desde $-10,4$ hasta -9 kb de la región 5' flanqueante del gen de *POMC* de ratón que incluye a nPE2. Estos primers fueron utilizados para la construcción del transgén 16 sin deleciones. Para realizar la serie de deleciones en el enhancer nPE2 se utilizaron pares de primers internos diseñados especialmente para generar cada deleción (Figura 37A). En la primer PCR se utilizan el primer 1 junto con un primer backward que aparea con su región 5' con la secuencia previa a la deleción y con su región 3' con la secuencia siguiente a la deleción (ver esquema de la Figura 37B).

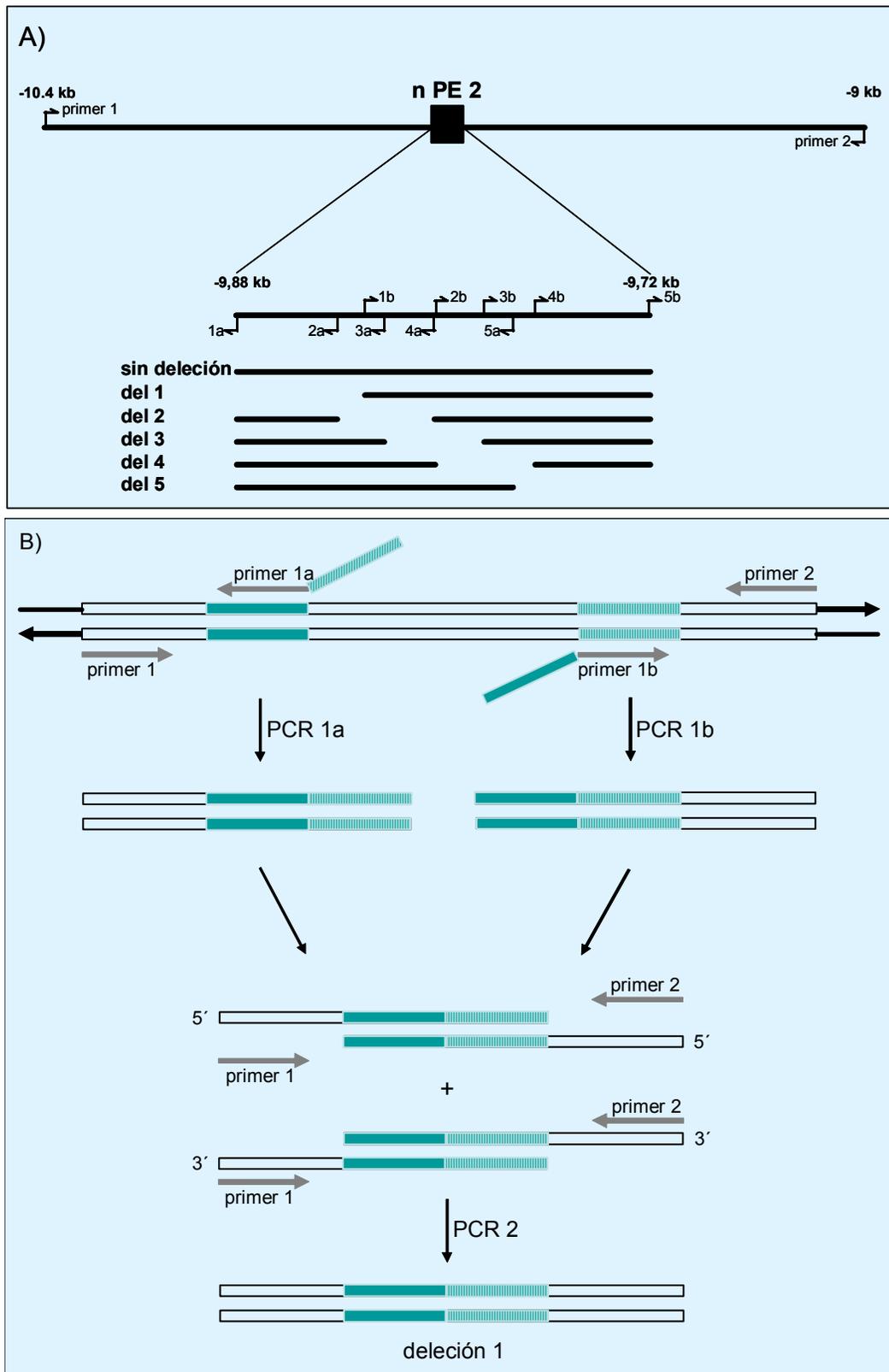


Figura 37: Esquema de deleciones por PCR utilizando megaprimeros. **A)** Esquema de primers usados para la construcción del transgén 16 sin deleciones y de los transgenes 16.Δ1 a 16.Δ5 con deleciones sucesivas superpuestas (del, deleción). **B)** Esquema general de la reacción.

Por otro lado, se utiliza el primer 2 junto con un primer forward que aparea con su región 3' con la secuencia siguiente a la delección y con su región 5' con la secuencia previa a la delección. De esta manera se generan dos fragmentos de PCR de la región 5' y 3' respectivamente que excluyen la secuencia delecionada. En una segunda reacción de PCR se utilizan los primers 1 y 2 y se usa como molde y megaprimers a los productos de la primera PCR que son complementarios en el sitio donde se encuentra la delección. Se utilizaron los siguientes primers:

Primer 1

5' ATA CGC GTC GAC TAG GCA AGA GAT GCC AGC TAG ACC TTA C 3'

Primer 2

5' ATA CGG GGT ACC TCC AGA AGG CAT CCT TGC ATA GTG CCT C 3'

La secuencia subrayada en el primer 1 es un sitio de restricción para Sal I y la secuencia subrayada en el primer 2 es un sitio de restricción para Kpn I. Estas enzimas fueron utilizadas luego para subclonar los fragmentos en el plásmido pTrap.

Primer 1a

5' CCA AAG GGC CCT TTA GCA CAG TAG CCC ACC 3'

Primer 1b

5' CTA CTG TGC TAA AGG GCC CTT TGG CTG TAA 3'

Primer 2a

5' CCT TTG GAT GGG CCC TTG AGA CGG CTT TCA TCC AC 3'

Primer 2b

5' CCG TCT CAA GGG CCC ATC CAA AGG TCA ATT GAA ATC 3'

Primer 3a

5' AGA AGA AGA ATG TTA CAG CCA AAG GGC CCT GGT GA 3'

Primer 3b

5' CTT TGG CTG TAA CAT TCT TCT TCT CCA CAC AAA TTG A 3'

Primer 4a

5' ATC AAT TTG TGT GGG GTT TTA ATT TGC TTT ATT AC 3'

Primer 4b

5' AAT TAA AAC CCC ACA CAA ATT GAT TCC TCT TTG CCC TTG A 3'

Primer 5a

5' CTT TAT GGC ATT GAA GAA TGA AAG AGA TTT CAA TTG A 3'

Primer 5b

5' CTT TCA TTC TTC AAT GCC ATA AAG GGG CCC AAC 3'

Se realizaron las siguientes PCRs:

- primers 1/2 para generar el fragmento sin deleción.
- primers 1/1a y 1b/2 para generar el fragmento con la deleción 1.
- primers 1/2a y 2b/2 para generar el fragmento con la deleción 2.
- primers 1/3a y 3b/2 para generar el fragmento con la deleción 3.
- primers 1/4a y 4b/2 para generar el fragmento con la deleción 4.
- primers 1/5a y 5b/2 para generar el fragmento con la deleción 5.

Las secuencias subrayadas en cada uno de los primers corresponden a la región complementaria del par compañero para realizar la deleción (por ejemplo, la región subrayada en el primer 1a es complementaria a la región no subrayada en el primer 1b).

Se realizó una PCR con una gran masa de DNA molde y pocos ciclos para disminuir la probabilidad de error en las secuencias amplificadas. A su vez se utilizó la polimerasa Pfu turbo (Stratagene) altamente eficiente y con muy baja tasa de error. Para los ciclos de la reacción se realizó una rampa de temperaturas de *annealing* para aumentar la especificidad del producto. Los fragmentos fueron amplificados en una termocicladora para tubos de plástico (MJ Research, PTC-200, Peltier Thermal Cycler) y los ciclos fueron los siguientes:

Desnaturalización inicial a 94°C por 5 min.

Desnaturalización a 94°C por 2 min.

Rampa de *annealing* de 60-55°C por 1 min.

Extensión a 72°C por 2 min.

10 ciclos de paso 2 a 4.

Desnaturalización a 94°C por 2 min.

Annealing a 55°C por 1 min.

Extensión a 72°C por 2 min.

10 ciclos de paso 6 a 8.

Extensión final a 72°C por 10 min.

Los fragmentos de 1.5 kb (de -10,5 a -9kb) fueron eluidos de un gel de agarosa y subclonados con el sistema Zero Background™/Kan Cloning Kit (Invitrogen) que disminuye el número de colonias no recombinantes (Bernard *et al.*, 1994). El vector de clonado, pZER0™-2, contiene el gen letal ccdB fusionado al extremo C-terminal de LacZ α . La inserción de un fragmento de DNA interrumpe la expresión del gen de fusión LacZ α -ccdB permitiendo el crecimiento sólo de las recombinantes positivas. Las células que contienen vectores no recombinantes, no crecen. Se utilizan las bacterias *E. coli* TOP10 porque esta cepa no contiene el gen lacI^q, factor inhibidor en trans del gen ccdB. La calidad de todas las secuencias fue confirmada por secuenciación.

Luego los plásmidos pZERO-2 conteniendo cada uno de los fragmentos fueron digeridos con las enzimas Sal I y Kpn I que contienen los primers 1 y 2 respectivamente y fueron subclonados río arriba del promotor del gen de la β -globina de pollo seguido del gen de β -galactosidasa del plásmido pTRAP.

Preparación de los transgenes para la microinyección pronuclear

Los transgenes a microinyectar se obtuvieron a partir de digestiones de maxipreparaciones de ADN plasmídico. Previo a la microinyección, todos los transgenes fueron digeridos con enzimas de restricción apropiadas: Not I y Sal I (transgenes de 1 a 12) y Not I (transgenes de 13 a 16 y de 16. Δ 1 a 16. Δ 5). Para descartar la secuencia del vector, el transgén fue aislado de un gel de agarosa y purificado usando las columnas de intercambio iónico Elutip-D (Schleicher & Schuell, Keene, NH). Luego fue precipitado con 10% v/v de NaAcO 3M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol 100% a -20°C por 2 h. Lavado dos veces con etanol 70% y resuspendido con buffer de microinyección (Tris-HCl 5mM, pH 7,4; EDTA 0,1 mM).

En este estudio se usaron casetes diferentes de reporteros por razones metodológicas y prácticas. La proteína verde fluorescente fue usada por nuestro grupo previamente para la identificación de neuronas de POMC (Cowley *et al.*, 2001; Heisler *et al.*, 2002). Los reporteros *LacZ* y *hGH* fueron elegidos porque contienen promotores mínimos de expresión y sitios de clonado adecuados y porque codifican para productos que facilitan la colocalización con anticuerpos contra péptidos de POMC.

Producción de ratones transgénicos

Animales y bioterio

Los animales 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 de jaulas independientes, que inyecta aire filtrado al interior de cada jaula y lo extrae al exterior de la sala (ver foto de la figura 38, Thoren Caging Systems, Inc. Hazleton, PA-USA). Las presiones de inyección y extracción están controladas. Así como un ciclo luz/oscuridad de 12 h (7:00-19h) y una temperatura ambiente que se mantiene entre 20 y 22°C. Los ratones reciben una dieta comercial de mantenimiento.



Figura 38: Foto de estanterías de jaulas ventiladas independientes.

Para obtener embriones aptos para la microinyección se aparean hembras C57Bl/6J con machos CBA/J y se obtienen híbridos de primera generación B6CBF₁ (ver esquema de la figura 39). Los machos B6CBF₁ se mantienen en jaulas individuales y se los utiliza como padrillos para fecundar hembras B6CBF₁ superovuladas. La superovulación se induce en hembras 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 5UI i.p. de PMS (*pregnant mare serum*) a las 15 h. Dos días más tarde los animales reciben 5UI i.p. de hCG (*human corionic gonadotrophin*) a las 13h.

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 plástica de cultivo de 35 mm con medio M2 (Sigma, NaCl 88 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂.H₂O 1,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄.7H₂O 1,2 mM, glucosa 5,5 mM, piruvato de sodio 0,33 mM, lactato de sodio (DL) 19,8 mM, EDTA 0,1 mM, BSA (fracción V) 0,3% penicilina 120 UI/ml, 50 µg/ml de sulfato de estreptomina, 0.001% de rojo fenol, HEPES 25 mM, pH 7,4). Mediante el uso de microscopio de disección, un par de fórceps y un par de agujas de 25G, 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 estiradas sobre una llama y se colocan en una gota de medio M2 con 1% de hialuronidasa por 5 min para separar los embriones de las células del *cumulus*. Luego los ovocitos se lavan pasándolos a través de 4 ó 5 gotas de medio M2, y finalmente se guardan hasta el momento de la microinyección de a grupos de 20 en gotas de M16 (Sigma, NaCl 88 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 23 mM, glucosa 5,5 mM, MgSO₄.7H₂O 1,2 mM, ácido láctico) 4,8 mM, piruvato de sodio 0,2 mM, lactato de sodio (DL) 19,8

mM, BSA (fracción V) 0,3% EDTA 0.1 mM, penicilina 120 UI/ml, 50 µg de sulfato de estreptomicina, 0.001% de rojo fenol) en un incubador a 37°C y 5% CO₂. La cantidad de ovocitos fertilizados obtenidos para ser microinyectados es de aproximadamente 20 por hembra superovulada.

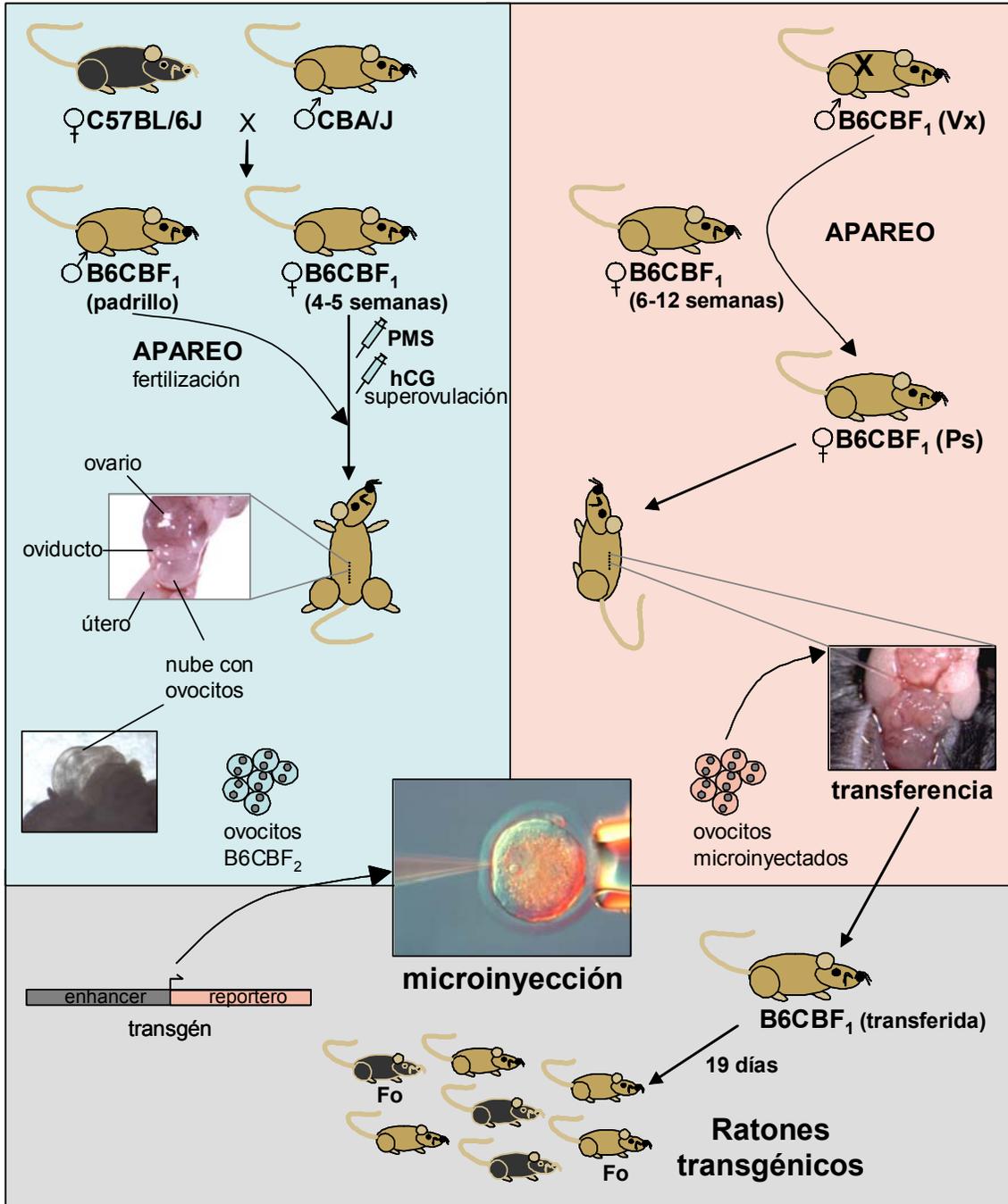


Figura 39: Esquema de producción de ratones transgénicos. La eficiencia de ratones transgénicos por ratón nacidos en nuestro laboratorio es del 30 %.

Microinyección pronuclear

Los ratones transgénicos fueron generados por microinyección pronuclear de cigotas B6CBF₂. 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 (Vertical Pipette Puller, Model 720, KOPF, David Kopf Instruments, Tujunga, California, USA). Los ovocitos se colocan en una gota de medio M2 equilibrado con HEPES ubicada en el centro de una depresión semiesférica cóncava de un portaobjetos, se observan bajo un microscopio invertido a través de un objetivo 40X de larga distancia de trabajo, con óptica de contraste de interferencia diferencial (FS Labovert, Leica) y se seleccionan aquellos que tengan ambos pronúcleos bien visibles. Con la ayuda de la pipeta sujetadora adosada a un micromanipulador manual (Leica, Alemania) se introduce la pipeta microinyectora dentro del pronúcleo más visible y se descarga aproximadamente 500 moléculas de transgén disueltas en 1 μ l de una solución estéril (Tris-HCl 5mM, pH 7,4; EDTA 0,1 mM) (ver fotos de la figura 40). Los embriones microinyectados son colocados en el incubador (37°C, 5 % CO₂) hasta el momento de la transferencia. Alrededor del 80% de los embriones sobrevive a la microinyección.

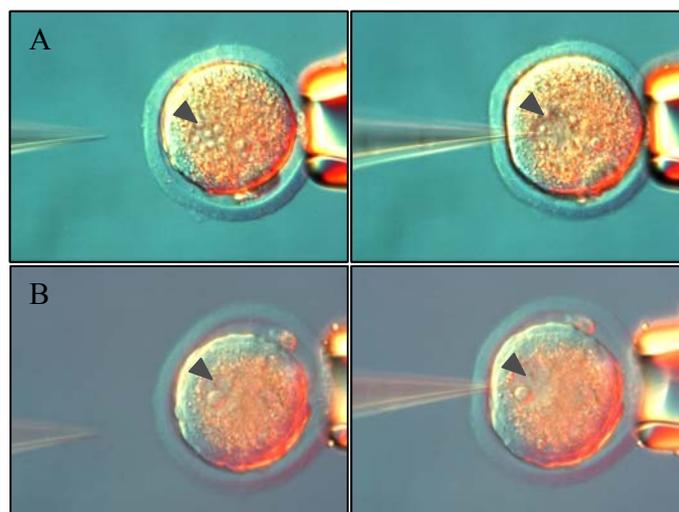


Figura 40: Fotos de microinyección de ovocitos. **A)** Microinyección de pronúcleo femenino. **B)** Microinyección de pronúcleo masculino. Las puntas de flecha señalan los pronúcleos.

Transferencia embrionaria a hembras pseudopreñadas

Las cigotas microinyectadas deben ser luego transferidas a los oviductos de hembras pseudopreñadas mediante microcirugía. La noche anterior a la recolección de embriones se ponen en contacto varias hembras jóvenes (de 6 y 9 semanas) con machos vasectomizados (Figura 39). A la mañana siguiente se seleccionan las hembras con tapón de esperma 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 un microscopio estereoscópico se expone el oviducto a transferir. Se rompe la membrana que recubre el oviducto y el ovario y se inserta una pipeta Pasteur fina cargada con los embriones microinyectados en la cínfula oviductal. Se descargan en total unos 20 a 30 embriones por oviducto. Luego de la transferencia se cierra la incisión con sutura (Figura 39).

Identificación de ratones transgénicos

Extracción de ADN genómico

Los ratones nacidos de embriones inyectados se apartan de sus madres adoptivas a los 18-20 días y se separan por sexo. Para determinar cuáles son transgénicos se realizan biopsias de la porción terminal de la cola con un bisturí bajo anestesia (avertina 300 mg/kg i.p.). Los ratones son marcados en las orejas para su posterior identificación. Los segmentos de cola extraídos se incuban a 55°C en buffer de digestión (Tris-HCl 50 mM, pH8; EDTA 100 mM; SDS 0.5%; 0,5 mg/ml de proteinasa K) durante 12-14 h. El ADN se extrae por métodos comunes. Brevemente, se centrifuga el producto de la digestión para eliminar los pelos, se precipita con 1 volumen de 2-propanol, se lava con 500 µl de etanol 70% y se resuspenden en 200 µl de TE buffer (100 mM Tris-Cl pH 7,4; 10 mM EDTA pH 8). La presencia del transgén se detecta por PCR con oligonucleótidos específicos de las secuencias transgénicas.

Para los transgenes de 1 a 4 y de 6 a 9 se utilizaron los primers:

M329: 5'-GAA GTA CGT CAT GGG TCA CT-3'

M330: 5'-AGC TCC CTC TTG AAC TCT AG-3'

Estos primers identifican una inserción heteróloga de 30 nucleótidos presente en el exón 3 de *POMC* en el único sitio Nco I (Figura 37) de los transgenes (Young *et al.*, 1998). Amplifican una banda de 180 pb a partir del gen endógeno de *POMC* y una banda de 210 pb a partir de los transgenes con la inserción.

Para los transgenes 5 y de 10 a 12, se utilizaron los primers:

TK: 5'-CAG CGT CTT GTC ATT GGC G-3'

GH: 5'-AGT GGT TCG GGG AGT TGG G-3'

Los cuales amplifican un producto de 170 pb de la secuencia TKGH.

Para el transgén 13 se utilizaron los primers HP3 y PPH9:

PPH9: 5'-TCA AGG GCA AAG AGG AAT CA-3'

Los cuales amplifican un producto de 800 pb de DNA específicamente humano.

Para el transgén 14 se utilizaron los primers:

PPH3: 5'-ANG AAT GCN GAG TTC TCC A-3' (degenerado)

y el primer HP1 que amplifican un producto de 900bp (la utilización de un primer degenerado se debe a que esta reacción fue probada para otros experimentos del

laboratorio y se demostró que funcionaba eficientemente para la detección del transgén).

Para el transgén 15 se utilizaron los primers:

PPH8: 5'-GGA TAA AAG CNG TCT CAA GG-3'

y HP4 que amplifican un producto de 600bp.

Para los transgenes 16 y de $\Delta 1$ a $\Delta 5$ se utilizaron los primers LZP y P:

LPZ: 5'-TCC CAG TCA CGA CGT TGT AAA ACG-3'

P: 5'-GGT ACC GCA TGC GAT ATC GAG CTC-3'

Que amplifican un producto de 166 bp específicamente del plásmido pTRAP.

A su vez se confirmó la presencia de las deleciones en los transgenes de 16. $\Delta 1$ a 16. $\Delta 5$ a través de primers que flanquean nPE2:

Delta 2.5: 5'- TGA TTT TAC TTG GGC CTC-3'

Delta 2.3: 5'- TCA GGC TTG TTC CCA TCC-3'

Que amplifican un producto de 340 pb de la región endógena sin deleción y de alrededor de 300 pb del transgén con la deleción.

Las condiciones de reacción son: 1 μ l de DNA genómico en buffer PCR (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; 0,25 mg/ml de BSA; tartrazina 1mM y $MgCl_2$ 2 mM); dNTPs 0,2 mM; 0,25 mM de cada primer y 1 UI de Taq polimerasa (Invitrogen) en un volumen

final de 10 μ l. Las muestras se amplifican en un termociclador de capilares (1605 Air Thermo Cycler, Idaho Technologies, Idaho Falls, ID) como se detalla a continuación: desnaturalización inicial a 94°C por 4 min; 33 ciclos de desnaturalización a 94°C por 5 segundos, annealing a 55°C (excepto primers M329/M330 con 60°C de annealing) por 10 segundos y elongación a 72°C por 20 segundos (o 40 segundos en los casos de productos mayores a 500pb); y una elongación final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR se corren en una gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0,1 μ g/ μ l de agarosa) y se visualiza a la luz UV.

El número de líneas independientes de ratones transgénicos es el siguiente: transgén 1 (1), transgén 2 (2), transgén 3 (2), transgén 4 (1), transgén 5 (3), transgén 6 (1), transgén 7 (2), transgén 8 (2), transgén 9 (5), transgén 10 (2), transgén 11 (1), transgén 12 (5), transgén 13 (3), transgén 14 (1), transgén 15 (1), transgén 16 (5), transgén 16. Δ 1 (5), transgén 16. Δ 2 (5), transgén 16. Δ 3 (6), transgén 16. Δ 4 (5) y transgén 16. Δ 5 (12).

Todos los animales fueron tratados respetando los principios de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por el Servicio Público de Salud de los Estados Unidos.

Análisis de la expresión del transgén

Inmunohistoquímica

Los ratones transgénicos adultos fueron perfundidos con 4 % de paraformaldeído (PFA) en KPBS (0,9 % NaCl, 16 mM K_2HPO_4 , 3,6 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) y los cerebros fueron extraídos, postfijados en PFA 4 % en KPBS toda la noche a 4°C y seccionados (50 μ m) con un vibrátomo (Vibratome 1000, Ted Pella, Redding, Calif.). Las secciones de cerebro fueron tratadas con 1 % de H_2O_2 en KPBS por 40 min, lavadas dos veces con KPBS e incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en KPBS-Triton X-100 al 0,3 % y 2 % de suero normal

de cabra. Los anticuerpos primarios utilizados fueron policlonales de conejo anti ACTH-IC-1 (1:1.000, National Hormone and pituitary Program, National Institute of Health, NIH), anti EGFP ab290 (1:1.000, AbCam) y anti hGH-IC-3 (1:1.000, National Hormone and pituitary Program, NHI). Al día siguiente, las secciones fueron lavadas en KPBS e incubadas con anticuerpo secundario, anti inmunoglobulina G de conejo biotinilado (1:200, Vector) diluido en KPBS-Triton X-100 al 0,3 % por dos horas a temperatura ambiente (TA). Luego de lavados en KPBS, las secciones fueron incubadas con el complejo avidina-biotina peroxidasa del rabanito (Vector) por una hora a TA, lavadas en KPBS y reveladas con diaminobencidina (25%, DAB, Sigma) y H₂O₂ al 0,05% en TBS (150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5). En ocasiones, algunas reacciones fueron reveladas con un cromógeno azul (SG kit, Vector). Las secciones teñidas fueron luego montadas en portaobjetos cubiertos con gelatina (1% Gelatina [Sigma], 0,1 % KCr(SO₄)₂), deshidratadas con gradientes de alcohol y xileno y luego cubiertas con cubreobjetos adheridos con Permount (Fisher Chemical, Fisher Scientific).

Inmunofluorescencia

Para verificar la colocalización entre EGFP y POMC, los cortes de cerebro con células que expresan EGFP fueron sujetas a una inmunohistoquímica anti-ACTH como se describe arriba hasta la incubación con el anticuerpo secundario y luego incubadas con streptavidina conjugada con Cy3 (1:800, Jackson Immunoresearch) en KPBS por 1 h a TA. Luego las secciones fueron lavadas en KPBS y montadas en portaobjetos con FluorSave (Calbioquem) y fotografiado con un microscopio (Leica, Wetzlar, Germany) bajo luz UV usando diferentes filtros para chequear la colocalización entre la fluorescencia verde de EGFP y la roja de ACTH-Cy3. El protocolo para las pituitarias fue similar excepto que previamente a la inmunohistoquímica las pituitarias perfundidas fueron deshidratadas con una serie ascendentes de concentraciones de sacarosa (10, 20 y 30% en PBS), congeladas embebidas en un medio (Tissue Tek) y seccionada con un criostato (Microm HM 505N; Micron, Heidelberg, Alemania) y post fijadas en PFA 4% por 20 min antes del comienzo de la inmunohistoquímica.

Doble hibridación *in situ* e inmunohistoquímica

Para colocalizar el mensajero de *POMC* y el producto del gen humano de *GH* (hGH) se realizó una hibridación *in situ* no radioactiva contra el ARNm de *POMC* seguido de una inmunohistoquímica con anticuerpo anti hGH en placa de plástico de 12 posillos. Se sintetizó una ribosonda de 600 pb del exón 3 del gen de *POMC* de ratón usando un kit de marcado con digoxigenina (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Secciones de cerebros fijados en PFA 4% y cortadas en vibrátomo (50 μ m), fueron tratadas con 0,1 M de trietanolamina (TEA), pH 8 por 3 min, seguidamente, incubadas en 0,0025% anhídrido acético en 0,1 M de TEA por 10 min para bloquear las cargas positivas, y lavadas dos veces en 2X de SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M Citrato de Sodio, pH7,2). Los corte de cerebro fueron incubados en solución de hibridación (50% formamida, 200 mM NaCl, 1X Solución Denhardt, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 10% sulfato de dextrano) por dos horas a 57°C. La ribosonda fue calentada a 65°C por 5 min (en 100 μ l de agua con 5 μ g de ARNt) y agregada a la solución de hibridación en cada posillo. La hibridación se realizó durante la noche a 57°C. Al día siguiente, las secciones fueron lavadas con 2X SSC por 10 min y sujetas a digestión con RNAsa A (20 μ g de RNAsa A/ml, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH8) a 37°C por 30 min, lavados con 1X SSC 15 min a TA y con 0,25X SSC por 30 min a 60°C. Luego los cortes fueron lavados en buffer 1 (0,1 M Tris-HCl pH7, 0,15 M NaCl) e incubados con anticuerpo anti digoxigenina monoclonal de ratón (1:5000, Jackson ImmunoResearch) en buffer 1 conteniendo 0,2 % de suero normal de cabra por 2 h a 37°C. Las secciones fueron luego lavadas una vez en buffer 1 y una vez en KPBS e incubadas con anticuerpo de cabra anti inmunoglobulina G de ratón biotinilado (1:200, Vector) por 2 h a TA y luego revelado con DAB como se describe arriba. Luego los cortes fueron lavados en KPBS e incubados con anticuerpo anti hGH (1:1.000) y finalmente revelados con cloruro de benzidina (Sigma) como se describe en Gelman *et al.* (2003). Los cortes fueron montados como se describe arriba.

Hibridación *in situ* radioactiva de las pituitarias

Las pituitarias fueron congeladas embebidas en medio de congelamiento (Tissue-Tek) y fueron cortadas en secciones de 16 μm con un criostato (Microm HM 505N; Micron, Heidelberg, Alemania) y colectadas en portaobjetos gelatinizados. Una ribosonda de 176 pb marcada con [α - ^{35}S] UTP fue sintetizada de un plásmido conteniendo parte del exón 5 del gen de hGH usando el kit MAXIscript (Ambion). La hibridación *in situ* se llevó a cabo como se describió previamente (Young *et al.*, 1998).

Tinción con X-Gal

Ratones adultos

Los ratones que llevaban los transgenes de 13 a 16 y de 16. Δ 1 a 16. Δ 5 fueron perfundidos con PFA 4% en KPBS. Los cerebros extraídos fueron post fijados con la misma solución por 1h 20min a 4°C y luego cortados en un vibrátomo en secciones de 50 μm . Las secciones fueron teñidas con 1mg de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico (X-Gal)/ml de solución de tinción (PBS pH 7,3, conteniendo 2,12 mg de ferrocianida de potasio/ml, 1,64 mg de ferricianida de potasio/ml, 2mM MgCl_2 , 0,01% deoxicolato de sodio, 0,02% NPO-40) por 4 h a 37°C. Las secciones teñidas fueron sujetas a inmunohistoquímica anti ACTH como se describe arriba.

Expresión en embriones

Hembras vírgenes B6CBF₁ fueron colocadas con machos B6CBF₁. Se controló la presencia de tapón vaginal cada mañana y una vez obtenido, la hembra fue separada del macho. Las hembras preñadas fueron sacrificadas en un día de gestación (E, embrionic day) predeterminado por dislocación cervical. Los embriones fueron extraídos rápidamente de la placenta, lavados en KPBS y colocados en PFA 4% en KPBS por 20 o 30 min según sean de E12,5 o E14,5. Luego fueron deshidratados con sacarosa 30% en KPBS a 4°C toda la noche y embebidos en medio de congelación para ser cortados en criostato a -20°C. Los

slides con los cortes se dejaron secar toda la noche a TA y luego fueron post fijados 10 min con PFA 4% frío y lavados con KPBS. Luego fueron sometidos a tinción con X-gal por 4h a 37°C y posteriormente a una inmunohistoquímica contra ACTH para ver colocalización. Se realizó el mismo protocolo descrito anteriormente con algunas modificaciones. Los slides fueron incubados con H₂O₂ 1% en KPBS por 30 min a TA en agitación leve. Después de dos lavados con KPBS fueron incubados con el anticuerpo primario anti ACTH usado anteriormente pero a mayor concentración (1:300) y durante 4 horas a 37°C. Luego de los lavados con KPBS se incubaron con el anticuerpo secundario (1:200) pero durante 1 hora a 37°C. Se lavaron los slides con KPBS y se los incubó con ABC (1 hora a TA). Finalmente, fueron revelados con DAB.

Secuencias y programas

Las secuencias del locus de *POMC* de la mayoría de las especies fueron obtenidos del sitio en internet de Ensembl (<http://www.ensembl.org>). La secuencia parcial de *F. catus* y *O. anatinus* fueron obtenidas de la base de datos de secuencias del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nih.gov/Traces/trace.cgi>). Las secuencias de humano y de ratón fueron comparadas usando el programa DOTTER (Sonnhammer *et al.*, 1995) descargado del sitio <http://www.cgb.ki.se/cgb/groups/sonnhammer/Dotter.html>, y las comparaciones múltiples fueron realizadas con el programa PipMaker, disponible en <http://bio.cse.psu.edu/pipmaker>). Los alineamientos múltiples fueron usados utilizando el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) on line en <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>. La identificación de sitios de unión para factores de transcripción alineados y conservados entre dos secuencias fue realizada usando el programa rVISTA (Loots *et al.* 2002, Loots y Ovcharenko, 2004, Frazer *et al.* 2004) en el sitio <http://www.dcode.org>. El programa Paircomp y la herramienta de visualización FamilyRelationsII fueron obtenidos del sitio <http://family.caltech.edu/>.

REFERENCIAS

Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000 **62** 413-437.

Ahima RS, Prabakara D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996 **82** 250-252.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990 **215** 403-410.

Appleyard SM, Bailey TW, Doyle MW, Jin YH, Smart JL, Low MJ, Andresen MC. Proopiomelanocortin neurons in nucleus tractus solitarius are activated by visceral afferents: regulation by cholecystokinin and opioids. *J Neurosci* 2005 **25** 3578-85.

Bagheri-Fam S, Ferraz C, Demaille J, Scherer G, Pfeifer D. Comparative genomics of the SOX9 region in human and *Fugu rubripes*: conservation of short regulatory sequence elements within large intergenic regions. *Genomics* 2001 **78** 73-82.

Barsh GS, Faroqui IS, O'Rahilly S. Genetics of body-weight regulation. *Nature* 2000 **404** 644-651.

Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers Jr MG. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 2003 **421** 856-859.

Bernard P, P Gabant, EM Bahassi, M Couturier. Positive selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene. *Gene* 1994 **148**-71-74.

Bertagna X, Nicholson WE, Sorenson GD, Pettengill OS, Mount CD & Orth DN. Corticotropin, lipotropin and β -endorphin production by a human nonpituitary tumor in tissue culture: evidence for a common precursor. *PNAS* 1978 **75** 5160-5164.

Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression—Belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999 **99** 451-454.

Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS. The role of SOCS3 in leptin signaling and leptin resistance. *JBC* 1999a **274** 30059-65.

Bjorbaek C, Elmquist JK, El-Haschimi K, Kelly J, Ahima RS, Hileman S, Flier JS. Activation of SOCS-3 messenger ribonucleic acid in the hypothalamus by ciliary neurotrophic factor. *Endocr* 1999b **140** 2035-2043.

Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1998 **1** 619-625.

Brenner S, Venkatesh B, Yap WH, Chou CF, Tay A, Ponniah S, Wang Y, Tan YH. Conserved regulation of the lymphocyte-specific expression of *Ick* in the *Fugu* and mammals. *PNAS USA* 2002 **99** 2936-41.

Brown CT, Xie Y, Davidson EH and Cameron A. Paircomp, FamilyRelationsII and Cartwheel: tools for interspecific sequence comparison. *BMC Bioinformatics* 2005 **6** 70-77.

Butler AA, Kesterson RA, Khong A, Cullen MJ, Pelleymounter MA, Dekoning J *et al.*. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin 3 receptor deficient mouse. *Endocrinology* 2000 **141** 3518-3521.

Cerda-Reverter JM, Schioth HB, Peter RE. The central melanocortin system regulates food intake in goldfish. *Regul Pept* 2003 **115** 101-13.

Challis BG, Coll AP, Yeo GS, Pinnock SB, Dickson SL, Thresher RR, Dixon J, Zahn D, Rochford JJ, White A, Oliver RL, Millington G, Aparicio SA, Colledge WH, Russ AP, Carlton MB, O'Rahilly S. Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *PNAS USA* 2004 **101** 4695-700.

Challis BG, Pritchard LE, Creemers JW, Delplanque M, Keogh JMJ, Luan J, *et al.*. A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum Mol Genetics* 2002 **11** 1997-2004.

Chang AC, Cochet M & Cohen SN. Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide. *PNAS* 1980 **77** 4890-4894.

Civelli O, Birnberg N & Herbert E. Detection and quantitation of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. *JBC* 1982 **257** 6783-6787.

Comuzzie AG. The emerging pattern of the genetic contribution to human obesity. *Best Pract Res Clin Endocr Metab* 2000 **16** 611-621.

Comuzzie AG, Hixson JE, Almasy L, Mitchell BD, Mahaney MC, Dyer TD, Stern MP, MacCluer JW, Blangero J. A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. *Nat Genetics* 1997 **15** 273-276.

Cone RD. The central melanocortin system and energy homeostasis. *Trends Endocrinol* 1999 **10** 211-216.

Couly GF, Le **Douarin** NM. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev Biol* 1985 **110** 422-439.

Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF, Cone RD. Integration of NPY, AGRP and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* 1999 **24** 155-163.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001 **411** 480-484.

Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ,

Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Fredman JM, Liu H, Pinto S, Comers WF, Cone RD, Horvath TL. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003 **37** 649-661.

De Keyzer Y, Bertagna X, Luton JP & Kahn A. Variable modes of proopiomelanocortin gene transcription in human tumors. *Molec Endocr* 1989 **3** 215-223.

Delplanque J, Barat-Houari B, Dina C, Gallina P, Clement K, Guy-Grand B, Vasseur F, Boutin P, Froguel P. Linkage and association studies between the proopiomelanocortin (POMC) gene and obesity in Caucasian families. *Diabetologia* 2000 **43** 1554-1557.

Drouin J & Goodman HM. Most of the coding region of rat ACTH beta-LPH precursor gene lacks intervening sequence. *Nature* 1980 **11** 610-613.

Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 1999 **23** 775-786.

Elkabes S, Loh YP, Nieburgs A, Wray S. 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* 1989 **46** 85-95.

Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 1999 **22** 221-232.

Emond M, Schwartz GJ, Ladenheim EE, Moran TH. Central leptin modulates behavioral and neural responsivity to CCK. *Am J of Physiol* 1999 **276** R1545-R1549.

Ericson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Dev* 1998 **125** 1005-1015.

Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Rol of melanocortinerig neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 1997 **385** 165-168.

Fan W, Ellacott KL, Halatchev IG, Takahashi K, Yu P, Cone RD. Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat Neurosci.* 2004 **7** 335-6.

Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GSH, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *New Eng J of Medicine* 2003 **348** 1085-1095.

Farooqi IS, Yeo GSH, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 2000 **106** 271-279.

Feng N, Adler-Wailles D, Elberg J, Chin JY, Fallon E, Carr A, Frazer T, Yanovski JA. Sequence variants of the POMC gene and their associations with body composition in

children. *Obesity Res* 2003 **11** 619-624.

Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN *et al.*. Inactivation of the mouse melanocortin 3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genetics* 2000 **26** 97-102.

Fickett JW, Wasserman WW. Discovery and modeling of transcriptional regulatory regions. *Curr Opin Biotechnol* 2000 **11** 19-24.

Frazer KA, Narla G, Zhang JL, Rubin EM. The apolipoprotein(a) gene is regulated by sex hormones and acute-phase inducers in YAC transgenic mice. *Nat Genetics* 1995 **9** 424-431.

Frazer KA, Pachter LS, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 2004 **32** W273-W279.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998 **395** 763-770.

Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI, Fu XY. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *PNAS USA* 2004 **101** 4661-6.

Gelman DM, Noaín D, Avale ME, Otero V, Low MJ, Rubinstein M. Transgenic mice engineered to target Cre/loxP-mediated DNA recombination into catecholaminergic neurons. *Genesis* 2003 **36** 196-202.

Gerets HH, Peeters K, Arckens L, Vandesande F, Berghman LR. Sequence and distribution of pro-opiomelanocortin in the pituitary and the brain of the chicken (*Gallus gallus*). *J Comp Neurol* 2000 **417** 250-62.

Good DJ. How tight are your genes? Transcriptional and posttranscriptional regulation of the leptin receptor, NPY, and POMC genes. *Hormones and Behavior* 2000 **37** 284-298.

Gottgens B, Barton LM, Gilbert JG, Bench AJ, Sanchez MJ, Bahn S, Mistry S, Grafham D, McMurray A, Vaudin M, Amaya E, Bentley DR, Green AR, Sinclair AM. Analysis of vertebrate SCL loci identifies conserved enhancers. *Nat Biotechnol* 2000 **18** 181-6.

Hager J, Dina C, Francke S, Dubois S, Houari M, Vatin V, Vaillant E, Lorentz N, Basdevant A, Clement K, *et al.*. A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genetics* 1998 **20** 304-308.

Hamernik DL, Keri RA, Clay CM, Clay JN, Sherman GB, Sawyer HR Jr, Nett TM, Nilson JH. Gonadotrope- and thyrotrope-specific expression of the human and bovine glycoprotein hormone alpha-subunit genes is regulated by distinct cis-acting elements. *Mol Endocr* 1992 **6** 1745-1755.

Hammer G, Fairchild-Huntress V, Low MJ. Pituitary-specific and hormonally regulated gene expression directed by the rat proopiomelanocortin promoter in transgenic mice. *Mol Endo* 1990 **4** 1689-1697.

Heisler LK, Cowley MA, Tecott LH, Fan W, Low MJ, Smart JL, Rubinstein M, Tatro JB, Marcus JN, Holstege H, Lee CE, Cone RD, Elmquist JK. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science* 2002 **297**: 609-611.

Hinney A, Becker I, Heibult O, Nottebom K, Schmidt A, Ziegler A, Mayer H, Siegfried W, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J. Systematic mutation screening of the pro-opiomelanocortin gene: identification of several genetic variants including three different insertions, one nonsense and two missense point mutations in probands of different weight extremes. *J of Clin Endocr and Metab* 1998 **83** 3737-3741.

Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibult O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Gorg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J. Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J of Clin Endocr and Metab* 1999 **84** 1483-1486.

Hixson JE, Almasy L, Cole S, Birnbaum S, Mitchell BD, Mahaney MC, Stern MP, MacCluer JW, Blangero J, Comuzzie AG. Normal variation in leptin levels is associated with polymorphisms in the proopiomelanocortin gene, POMC. *J Clin Endocr Metab* 1999 **84** 3187-3191.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR *et al.*. Targeted disruption of the melanocortin 4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997 **88** 131-141.

Japon M, Rubinstein M, Low MJ. In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* 1994 **42** 1117-1125.

Jimenez G, Gale KB, Enver T. The mouse β -globin locus control region: hypersensitive sites 3 and 4. *Nucleic Acids Res* 1992 **20** 5797-5803.

Jones PL, Wolfe AP. Relationship between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol* 1999 **9** 339-347.

Kiec-Wilk B, Dembinska-Kiec A, Olszanecka A, Bodzioch M, Kawecka-Jaszcz K. The selected pathophysiological aspects of PPARs activation. *J Physiol Pharmacol* 2005 **56** 149-162.

Kieslinger M, Folberth S, Dobrev G, Dorn T, Croci L, Erben R, Consalez GG, Grosschedl R. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 2005 **9** 757-67.

Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G & Gruters A. Severe early onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics* 1998 **19** 155-157.

Krude H, Gruters A. Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: the POMC deficiency Syndrome. *TEM* 2000 **11** 15-22.

Lamolet B, Poulin G, Chu K, Guillemot F, Tsai M, Drouin J. Tpit-independent function of NeuroD1(BETA2) in pituitary corticotroph differentiation. *Mol Endocr* 2004 **18** 995-1003.

Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 2001 **104** 849-859.

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

Lee YC, Asa SL, Drucker DJ. 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* 1992 **267** 10705-10708.

Lee Y, Wang MY, Kakuma T, Wang ZW, Babcock E, Mc-Corkle K, Higa M, Zhou YT, Unger RH. Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic rol of hyperleptinemia. *JBC* 2001 **276** 5629-5635.

Levy S, Hannehalli S, Workman C. Enrichment of regulatory signals in conserved non-coding genomic sequence. *Bioinformatics* 2001 **17** 871-7.

Li CH, Barnafi L, Chretien M & Chung D. Isolation and structure of beta LPH from sheep pituitary gland. *Nature* 1965 **208** 1093-1094.

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

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

Liu NA, Huang H, Yang Z, Herzog W, Hammerschmidt M, Lin S, Melmed S. Pituitary corticotroph ontogeny and regulation in transgenic zebrafish. *Mol Endocr* 2003 **17** 959-66.

Loots GG, Locksley RM, Blankespoor CM, Wang ZE, Miller W, Rubin EM, Frazer KA. Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science*. 2000 **288** 136-40.

Loots GG, Ovcharenko I. rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res* 2004 **32** W217-W221.

Loots GG, Ovcharenko I, Pachter L, Dubchak I, Rubin EM. rVISTA for comparative sequence-based discovery of functional transcription factor binding sites. *Genome Res* 2002 **12** 832-839.

Ludwig DS, Ttritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice

leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2001 **107** 379-386.

Mains RE, Eipper BA & Ling N. Common precursor to corticotropins and endorphins. *PNAS* 1977 **74** 3014-3018.

Mayor C, Brudno M, Schwartz JR, Poliakov A, Rubin EM, Frazer KA, Pachter LS, Dubchak I. VISTA: visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length. *Bioinformatics* 2000 **16** 1046-1047.

Moran TH. Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* 2000 **16** 858-865.

Munzberg H, Huo L, Nilni EA, Hollenberg AN, Bjorbaek C. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology* 2003 **144** 2121-31.

Nakamura H, Watanabe Y. Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon. *Int Dev Biol* 2005 **49** 231-235.

Nakamura MT, Nara TY. Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochem Soc Trans* 2002 (Pt 6) 1076-1079.

Nakanishi S, Anoue A, Kita T, Nakamura M, Chang ACY, Cohen SN *et al.*. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. *Nature* 1979 **278** 423-427.

Osaki E, Nishina Y, Inazawa J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ohsugi M, Tezuka T, Yoshida M, Semba K. Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nucleic Acids Res* 1999 **27** 2503-10.

Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res* 2004 **32** W280-W286.

Overstreet LS, Hentges ST, Bumashny VF, de Souza FS, Smart JL, Santangelo AM, Low MJ, Westbrook GL, Rubinstein M. A transgenic marker for newly born granule cells in dentate gyrus. *J Neurosci* 2004 **24**:3251-3259.

Palkovits M, Mezey E, Eskay RL. Pro-opiomelanocortin-derived peptides (ACTH/ β -endorphin/ α -MSH) in brainstem baroreceptor areas of the rat. *Brain Res* 1987 **436** 323-328.

Pennacchio LA, Rubin EM. Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nature Rev Genetics* 2001 **2** 100-109.

Pfeffer PL, Bouchard M, Busslinger M. Pax2 and homeodomain proteins cooperatively regulate a 435 bp enhancer of the mouse Pax5 gene at the midbrain-hindbrain boundary. *Development* 2000 **127** 1017-1028.

Poulin G, Turgeon B, Drouin J. NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 1997 **11** 6673-6682.

Powis JE, Bains JS, Ferguson AV. Leptin depolarizes rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *Am J Physiol* 1998 **274** R1468-72.

Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 1995 **23** 4878-4884.

Raffin-Sanson ML, de Keyser Y and Bertagna X. Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *Euro J of Endocr* 2003 **149** 79-90.

Rotimi CN, Comuzzie AG, Lowe WL, Luke A, Blangero J, Cooper RS. The quantitative trait locus on chromosome 2 for serum leptin level is confirmed in African-Americans. *Diabetes* 1999 **48** 643-644.

Rowitch DH, Echelard Y, Danielian PS, Gellner K, Brenner S, McMahon AP. Identification of an evolutionarily conserved 110 base-pair cis-acting regulatory sequence that governs Wnt-1 expression in the murine neural plate. *Development* 1998 **125** 2735-46.

Rubinstein M, Japon JA, Low MJ. Introduction of a point mutation into the mouse genome by homologous recombination in embryonic stem cells using a replacement type vector with a selectable marker. *Nucleic Acids Res* 1993a **21** 2613-2617.

Rubinstein M, Mogil JS, Japon M, Chan EC, Allen RG, Low MJ. Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking β -endorphin by site-directed mutagenesis. *PNAS* 1996 **93** 3995-4000.

Rubinstein M, Mortrud M, Liu B, Low MJ. Rat and mouse proopiomelanocortin gene sequence target tissue-specific expression to the pituitary gland but no to the hypothalamus of transgenic mice. *Neuroendocr* 1993b **58** 373-380.

Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 2002 **36** 199-211.

Schwartzberg DG, Nakane PK. ACTH-related peptide containing neurons within the medulla oblongata of the rat. *Brain Res* 1983 **276** 351-356.

Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Leptin increases hypothalamic proopiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 1997 **46** 2119-2123.

Schwartz MW, Woods SC, Porte DJr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000 **404** 661-671.

Schwartz S, Zhang Z, Frazer KA, Smith A, Riemer C, Bouck J, Gibbs R, Hardison R, Miller W. PipMaker—a web server for aligning two genomics DNA sequences. *Genome Res* 2000 **10** 577-586.

Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-

concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 1998 **396** 670-674.

Shima Y, Zubair M, Ishihara S, Shinohara Y, Oka S, Kimura S, Okamoto S, Minokoshi Y, Suita S, Morohashi K. Ventromedial hypothalamic nucleus-specific enhancer of Ad4BP/SF-1 gene. *Mol Endocrinol* 2005 **19** 2812-23.

Simonet WS, Bucay N, Pitas RE, Lauer SJ, Taylor JM. Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. *J Biol Chem* 1991 **266** 8651-8654.

Smith AI, Funder JW. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues. *Endocr Rev* 1988 **9** 159-179.

Sonnhammer EL, Durbin R. A dot-matrix program with dynamic threshold control suited for genomic DNA and protein sequence analysis. *Gene* 1995 **167** GC1-GC10.

Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001 **104** 531-543.

Steiner DF, Clark JL, Nolan C, Rubenstein AH, Margoliash E, Aten B *et al.*. Proinsulin and the biosynthesis of insulin. *Recent Progress in Hormone Research* 1969 **25** 207-282.

Stormo GD. DNA binding sites: representation and discovery. *Bioinformatics* 2000 **16** 16-23.

Suviolahti E, Ridderstrale M, Almgren P, Klannemark M, Melander O, Carlsson E, Carlsson M, Hedenbro J, Orho-Melander M. Pro-opiomelanocortin gene is associated with serum leptin levels in lean but not in obese individuals. *International J of Obesity* 2003 **27** 1204-1211.

Szeto DP, Ryan AK, O'Connell SM, Rosenfeld MG. P-OTX: a PIT-1 interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *PNAS USA* 1996 **93** 7706-7710.

Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL *et al.*. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Dev* 1998 **125** 4835-4840.

Talbot D, Collis P, Antoniou M, Vidal M, Grosveld F, Greaves DR. A dominant control region from the human beta-globin locus conferring integration site-independent gene expression. *Nature* 1989 **338** 352-355.

Tartaglia LA. The leptin receptor. *JBC* 1997 **272** 6093-6096.

Therrien M, Drouin J. Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 1993 **13** 2342-2353.

Thomas JW, Touchman JW. Vertebrate genome sequencing: building a backbone for comparative genomics. *Tren Genet* 2002 **18** 104-8.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994 **22** 4673-4680.

Tollemer H, Teitsma CA, Leprince J, Bailhache T, Vandesinde F, Kah O, Tonon MC, Vaudry H. Immunohistochemical localization and biochemical characterization of two novel decapeptides derived from POMC-A in the trout hypothalamus. *Cell Tissue Res* 1999 **295** 409-17.

Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP *et al.*. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev* 1998 **12** 1691-1704.

Tremblay Y, Tretjakoff I, Peterson A, Antakly T, Zhang CX, Drouin J. Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of a proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice. *PNAS USA* 1988 **85** 8890-8894.

Uchikawa M, Ishida Y, Takemoto T, Kamachi Y, Kondoh H. Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Dev Cell* 2003 **4** 509-19.

Wasserman WW, Sandelin A. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nature Rev Genetics* 2004 **5** 276-287.

Watson SJ, Akil H, Richard CWd, Barchas JD. Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. *Nature* 1978 **275** 226-228.

Wingender E, Chen X, Fricke E, Geffers R, Hehl R, Liebich I, Krull M, Matys V, Michael H, Ohnhauser R, Pruss M, Schacherer F, Thiele S, Urbach S. The TRANSFAC system on gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* 2001 **29** 281-283.

Yalow RS & **Berson** SA. Size heterogeneity of immunoreactive human ACTH in plasma and in extracts of pituitary glands and ACTH-producing thymoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1971 **44** 439-445.

Yaswen L, Diehl N, Brennan MB & Hochgeschwender U. Obesity in the mouse model of proopiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature Medicine* 1999 **5** 984-985.

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

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994 **372** 425-432.



Fin.