



Relació entre Neurogenina3 i la via de senyalització Wnt en la formació de les cèl·lules beta del pàncrees

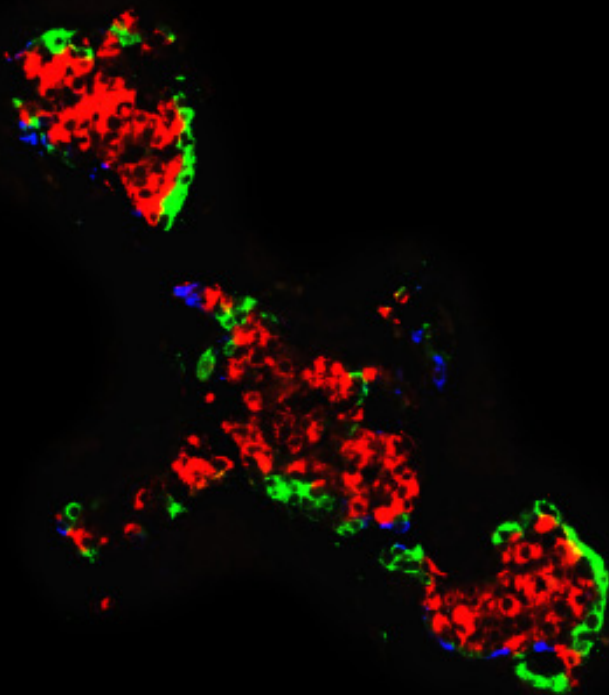
Gemma Pujadas i Rovira

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Relació entre Neurogenina3 i la via de senyalització Wnt en la formació de les cèl·lules beta del pàncrees



Gemma Pujadas i Rovira
2012



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

**RELACIÓ ENTRE NEUROGENINA3 I LA VIA DE
SENYALITZACIÓ WNT EN LA FORMACIÓ DE LES
CÈL·LULES BETA DEL PÀNCREES**

Tesi doctoral presentada per

Gemma Pujadas i Rovira

Per optar al títol de

Doctora per la Universitat de Barcelona



Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la doctora Rosa M Gasa i la co-direcció del doctor Ramon Gomis en el Laboratori de Diabetis i Obesitat de l'IDIBAPS

Dra. Rosa M Gasa Arnaldich

Dr. Ramon Gomis de Barbarà

Gemma Pujadas i Rovira

Barcelona, Abril 2012

A la meva família

Al Dani

AGRAÏMENTS

La vida és com un llibre, ara s'acaba un altre capítol i, per tant, toca fer balanç de les persones que t'han ajudat a escriure'l i dels moments viscuts.

Primer de tot, m'agradaria agrair al co-director d'aquesta tesi, el Dr. Ramon Gomis, per donar-me l'oportunitat de poder realitzar la tesi i de formar part del seu grup de recerca en el laboratori de Diabetis i Obesitat.

En especial i per molts motius a la directora d'aquesta tesi, la Dra. Rosa Gasa. Tot i caure en el més tòpic dels tòpics, sense ella aquesta tesi no hagués estat possible. El seu entusiasme per la ciència i la capacitat de transmetre'l dia a dia, i malgrat els entrebancs i les dificultats, sempre ha trobat un costat positiu del qual treure'n forces i seguir endavant. Per la seva qualitat com a investigadora, font inesgotable d'idees, però sobretot per la seva vessant humana. Per estar en els mals moments i en els bons, dels quals m'emporto molts records. Com em vas dir un dia, espero que aquest "cordó umbilical" que s'ha creat perduri de per vida. Sempre tindrè l'honor de ser la teva primera becaria. Sincerament, MOLTES GRÀCIES ROSA.

A la Dra. Anna Novials, que dirigeix el laboratori intentant posar una mica d'ordre en un món que en té ben poc, per ajudar-me a superar els problemes de salut que han sorgit durant la tesi i per facilitar-me la possibilitat de trobar una sortida professional ben a prop.

A la meva "compi" *in eternum!* Podria estendre'm fins l'infinit i més enllà i encara em faltaria espai per poder-te agrair aquests cinc anys compartits. Sense el teu toc de *glamour*, el grup de les neurogenines no seria el mateix ☺. El camí ha sigut llarg i en alguns moments dur, però he tingut la gran sort de compartir-lo amb algú com tu. Han estat molts cafès matiners, de migdia i tardans, moments de desesperació i de mal humor perquè les coses no surten i no trobes una explicació, molts assajos de presentacions i moments de pànic escènic compartits (mmmm...It's OK!). Només afegiré una última cosa, i és que: "*lo que ha unido esta tesis, que no lo separe el hombre*". Gràcies Zape!

A la Sara, que tot i haver compartit menys temps juntes en el grup m'ha ajudat a preguntar-me encara més el perquè de les coses i agafar moltes més manies de les que ja tenia! ☺ Gràcies per fer-nos avançar una miqueta més en aquest món de bojós.

A la Lidia... Què dir de la Lidia? Amb ella vaig començar els meus primers passos en el laboratori. Gràcies per tenir la paciència d'ensenyar-me un munt de tècniques i a saber distribuir i aprofitar al màxim els minuts per a no "pringar" els caps de setmana i sobretot pels teus moments de truquis *Lidia-MacGyver*.

A la resta de tècnics del laboratori, a l'Ainhoa, per ajudar-me en les tasques de l'estabulari i ensenyar-me les tècniques bàsiques de treballar amb animals, una persona que viu amb entusiasme la seva feina. A la Yaiza, per ajudar-me quan m'han faltat mans i hores per a fer algun que altre western. Al Carlos que a hores d'ara encara em vol canviar el nom per la patrona de Catalunya.

Als meus companys de batalla. Als que quan vaig començar encara em podien dir la becaria "novata" i que amb el temps han anat deixant el laboratori i m'han donat el relleu de la veterania. La Marta Amigó amb la que vaig compartir inicialment projecte a part de molts moments de bogeria. El Jordi Altirriba, alias Dr. Google, i l'Esther Llagostera, ambdós amb una bondat extrema i amb un futur científic indiscutible. Gràcies pel vostre temps, consells i ànims en aquesta última etapa, tot i que des de la llunyania. Molta sort als dos, us la mereixeu.

També als becaris als quals delego la responsabilitat de la veterania del món dels becaris, és a dir...ben poca cosa ☺. A la noia tímida de la Cerdanya, gràcies Montsita per donar-me el plaer de compartir aquests anys al teu costat i que espero que en siguin molts més, ànims que ja queda poc! A les portugueses que van començar a fer internacional el laboratori, la Joana i la Lisa. Al Fabian, "aqueu xileno" que va aprendre català i que ens feia riure a tothora, danonino!!! Als "peques" (ja no tant ☺) del lab, l'Alba i el Marc amb els que he compartit molts moments tan dins com fora del laboratori, i que sincerament, espero que ens en quedin molts per a viure plegats. Ànims, que això passa volant i sense adonar-vos-en estareu en el mateix punt que jo, escrivint!! I als pre-docs nouvinguts, l' "alegria de la huerta", l'Albuki, i a la "*xixina*" del laboratori, la Valeria, ànims que aquesta muntanya russa acaba d'arrencar. I en especial a la Marta, que tot i tardar a arrencar un somriure, crec que al final ho hem aconseguit ☺. Coffee-friend... let it flow!!

A la "Labma", la Juli, per organitzar tot el tema de factures i comandes i per la paciència que ha tingut amb la frase: "Marta, una pregunteta...". Als post-docs que han

passat pel lab, la Sandra “Rebu” gracias por hacernos tus *Guinea Pig* en temas culinarios, echaré de menos tus desayunos a la francesa y el día internacional de las *crepes*, la Maud amb la que hem viscut molts capítols d’una sèrie que avança en la segona temporada ☺, la Nathalie i la Paola, i als que encara hi són, així com a les noves incorporacions la Rebeca, la Rita, la Helena, la Elaine, la Gema, la Laura i l’Edu (ánimos *mini boss*). Molta sort a tots! I a la Lucia, la meva nova companya de laboratori, amb la que he compartit l’estrès de l’escriptura, i amb la que n’estic segura, en compartiré alguns més.

Als IP del laboratori, la Marce amb la que pràcticament he compartit tota la meva etapa pre-doctoral i alguns mesos de proximitat de poiata, seguro que me echas de menos haciendo mis “guarraditas” habituales! Al Joan Marc, que amb les seves “temudes” preguntes m’ha ajudat a avançar i a obtenir més resultats per a la tesi. Al Marc Claret, el enanito gruñón, sense el qual la frase... “a Londres això no passava”, no tindria sentit. I als IP que han vingut més recentment, el Carles Lerin i el Pablo Garcia.

Als companys de la “uni” amb els que he compartit moltes hores, entre classes, pràctiques i, perquè no dir-ho, al bar. A les meves nenes, Ester, Roser i Dúnia, per recolzar-me i donar-me ànims en moments de decaïment emocional i per fer-me valorar el sentit de l’amistat. Hem compartit moments molt importants de la nostra vida, i per a mi aquest n’és un. Moltes gràcies per ser-hi.

Per últim, a la meva família, als meus pares que m’han educat sota uns valors que m’ajuden a avançar dia a dia i que fan de mi la persona que avui sóc. Sense ells i el seu recolzament constant, avui no podria tancar aquesta etapa de la meva vida. Al meu avi i la meva àvia Manela, que de diferent manera m’han ensenyat l’important que és viure la vida dia a dia i lluitar pel que un més vol, que això passa ràpid. De ben segur que els agradaria estar aquí per veure que ho he aconseguit. A la meva àvia Rosenda, que sí que pot gaudir d’aquest moment i jo de compartir-lo amb ella. Gràcies. Al meu padrí, que sense saber-ho, em va portar cap als camins de la recerca.

Al meu germà, gràcies per tot, per ser com ets, per ajudar-me en molts aspectes de la vida, tot i que en el seu moment... no tocava una lliçó d’àlgebra!!! ☺. Gràcies per fer de germà gran! I sobretot, gràcies per tenir la paciència d’aportar el teu granet de sorra

en aquesta tesi. Has flipat amb els caldos de Nadal que fem oi? A la meva *cunyi*!! Per fer créixer aquesta unió de dos. Gràcies per ser allà quan us necessito, als dos!

I finalment, al Dani, el millor company de viatge. Cada dia que passa em sento més afortunada d'haver-te trobat en aquest món de bojos. Gràcies per entendre i compartir la importància que té per a mi seguir, com tu dius, "un ordre establert" i per deixar tancar aquest capítol abans d'iniciar els següents.

GRÀCIES A TOTS!!

ÍNDEX

AGRAÏMENTS	vii
ÍNDEX.....	xiii
ÍNDEX FIGURES I TAULES.....	xxi
ABREVIACIONS.....	xxix
<u>I. INTRODUCCIÓ</u>	1
1. EL PÀNCREES I LA DIABETIS MELLITUS	3
1.1. El pàncrees.....	3
1.1.1. Pàncrees exocrí.....	3
1.1.2. Pàncrees endocrí.....	4
1.2. La diabetis mellitus.....	7
1.2.1. Classificació de la diabetis.....	7
1.2.2. Teràpies pel tractament de la diabetis.....	12
2. DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DEL PÀNCREES ENDOCRÍ	15
2.1. Morfogènesi pancreàtica.....	15
2.2. Control transcripcional del desenvolupament pancreàtic.....	16
2.2.1. Factors de transcripció expressats en els progenitors pancreàtics primerencs.....	20
2.2.2. Factors de transcripció implicats en la determinació del destí endocrí versus exocrí: la família dels factors de transcripció bHLH.....	22
2.2.3. Factors de transcripció que participen en la diferenciació endocrina i determinació dels diferents subtipus cel·lulars endocrins. Dianes gèniques de Neurog3.....	29
2.3. Vies de senyalització implicades en el desenvolupament del pàncrees.....	35
3. LA VIA DE SENYALITZACIÓ WINGLESS (WNT)	39
3.1. Introducció general i components principals.....	39
3.1.1. Via canònica Wnt/ β -catenina.....	40
3.1.2. Vies no canòniques.....	43
3.2. Via de senyalització Wnt: desenvolupament pancreàtic.....	44
3.2.1. Expressió de components de la via Wnt en pàncrees embrionari.....	44
3.2.2. La importància de β -catenina en l'organogènesi pancreàtica.....	45
3.2.3. Modulació d'altres components de la via Wnt.....	49

3.3. Els lligands Wnt.....	51
3.3.1. El lligand Wnt9a.....	54
<u>II. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS.....</u>	59
<u>III. MATERIALS I MÈTODES.....</u>	63
1. LÍNIES CEL·LULARS.....	65
1.1. Manteniment de les línies cel·lulars.....	65
1.1.1. Tripsinització i comptatge.....	66
1.1.2. Criopreservació de cèl·lules.....	66
1.1.3. Descongelació de cèl·lules.....	66
1.2. Generació de la línia cel·lular estable NIH3T3-myc-Wnt9a.....	66
1.2.1. Creació.....	66
1.3. Assajos luciferasa.....	67
1.3.1. Transfeccions transitòries.....	67
1.3.2. Assaig dual d'activitat luciferasa renilla.....	68
2. DNA.....	68
2.1. Amplificacions de DNA-anàlisi de l'expressió gènica.....	68
2.1.1. PCR convencional.....	68
2.1.2. PCR a temps real.....	69
2.1.3. Validació encebadors.....	71
2.2. Electroforesi en gel d'agarosa.....	71
2.2.1. Separació de transcrits de DNA en agarosa.....	71
2.2.2. Purificació de bandes d'agarosa.....	72
2.3. Vectors d'expressió.....	72
2.3.1. Amplificació per a la clonació de gens.....	73
2.3.2. Digestió de vectors.....	73
2.3.3. Lligació de fragments.....	74
2.3.4. Clonació de fragments de PCR.....	74
2.3.5. Transformació de bacteris competents.....	75
2.3.6. Amplificació (creixement de bacteris en medi líquid).....	76

2.3.7. Purificació de plasmidis bacterians.....	77
2.3.8. Amplificació per a seqüenciació	78
2.4. Vectors d'expressió creats	78
2.4.1. pCMVTnt-Wnt9a	78
2.4.2. pCMVTnt-Wnt7b	79
2.4.3. PAC.CMV-Wnt9a.....	79
2.4.4. pCDNA3.1-myc.Wnt9a	79
2.5. Immunoprecipitació de cromatina (ChIP).....	79
3. RNA	82
3.1. Extracció de RNA	82
3.1.1. Mètode de purificació per trizol.....	82
3.1.2. Mètode de purificació per columnes (RNeasy mini kit).....	83
3.1.3. Mètode de purificació per fenol/cloroform.....	84
3.2. Quantificació del RNA i determinació de la seva integritat.....	86
3.2.1. Determinació de la integritat del RNA per electroforesi en gel d'agarosa desnaturalitzant.....	86
3.2.2. Determinació de la seva integritat per bioanalyzer.....	87
3.3. Retrotranscripció de RNA a cDNA	88
3.3.1. Eliminació de DNA.....	88
3.3.2. Protocol superscript III	88
4. ADENOVIRUS RECOMBINANTS	89
4.1. Generació de l'adenovirus Ad.CMV-Wnt9a.....	89
4.2. Amplificació d'adenovirus recombinants	90
4.3. Aïllament de DNA víric	90
4.4. Titulació d'adenovirus recombinants	91
4.5. Infecció amb adenovirus recombinants	92
5. PROTEÏNES	93
5.1. Extracció de proteïnes.....	93
5.1.1. Extracció de proteïnes de cultius cel·lulars	93

5.2. Quantificació de proteïnes.....	94
5.3. Detecció de proteïnes.....	94
5.3.1. Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE).....	94
5.3.2. Transferència humida de proteïnes.....	95
5.3.3. Bloqueig de la membrana de PVDF.....	96
5.3.4. Immunodetecció de proteïnes.....	97
5.3.5. Eliminació dels anticossos (stripping).....	97
5.3.6. Immunoprecipitació (IP).....	98
5.3.7. Immunohistoquímica.....	98
6. MICROSCOPIA I MUNTATGE D'IMATGES DE MORFOMETRIA.....	106
7. MODELS ANIMALS.....	107
7.1. Genotipatge.....	107
7.1.1. Extracció de DNA genòmic.....	107
7.1.2. Amplificació de DNA (PCR convencional).....	108
7.2. Determinació de glicèmia i insulinèmia d'animals en estadi post-natal 1 (P1).....	108
7.2.1. Determinació de la concentració d'insulina (ELISA).....	109
7.3. Determinació del contingut total d'insulina en pàncrees d'animals en estadi post-natal 1 (P1).....	109
7.4. Test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (IPGTT).....	110
7.5. Determinació de l'activitat b-galactosidasa en teixit.....	110
7.6. Aïllament d'illots de ratolí adult.....	111
<u>IV. RESULTATS</u>.....	113
1. LA CONNEXIÓ ENTRE ELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ BHLH NEUROG3 I MATH6 I LA VIA DE SENYALITZACIÓ WNT.....	115
1.1. Identificació de gens relacionats amb la via Wnt com a dianes de Neurog3 i Math6....	115
1.1.1. Microarrays d'expressió.....	115
1.1.2. La via Wnt com a diana de Neurog3 i Math6.....	117
1.2. Regulació directa de la via canònica Wnt/ β -catenina pels factors bHLH Neurog3 i Math6.....	122
1.2.1. Efectes de Neurog3 i Math6 sobre l'activació de la via Wnt.....	122

2. IDENTIFICACIÓ DELS LLIGANDS WNT7B I WNT9A COM A POSSIBLES DIANES DE NEUROG3 I MATH6.....	125
2.1. Comprovació resultats dels microarrays per PCR a temps real.....	125
2.2. Expressió en pàncrees embrionari dels lligands Wnt7b i Wnt9a.....	126
2.2.1. Expressió gènica dels lligands Wnt7b i Wnt9a en diferents línies cel·lulars pancreàtiques.....	130
2.2.2. Identificació de les cèl·lules que expressen Wnt9a en el pàncrees	131
2.3. Regulació de l'expressió del lligand Wnt9a en el model de cèl·lules ductals de ratolí mPAC.....	133
2.3.1. Activació del gen de Wnt9a per part de Neurog3	133
2.3.2. Modificacions epigenètiques de la regió promotora de Wnt9a en resposta a Neurog3	134
2.3.3. Regulació del gen de Wnt9a per altres factors bHLH.....	137
2.3.4. Regulació del gen de Wnt9a per components de la cascada endocrino-pancreàtica.....	137
2.4. Paper del lligand Wnt9a en el programa transcripcional endocrí sota el control de Neurog3	141
2.5. Estudi dels efectes del lligand Wnt9a sobre l'activació de la via Wnt	143
2.5.1. Acció autocrina de Wnt9a sobre la via Wnt canònica.....	144
2.5.2. Acció paracrina sobre la via Wnt canònica.....	145
2.5.3. Regulació de β -catenina i Tcf712 per Wnt9a.....	148
2.5.4. Regulació de les vies no canòniques per Wnt9a.....	149
3. ESTUDI DEL FENOTIP PANCREÀTIC DEL MODEL MURÍ GEN ANUL·LAT DE WNT9A.....	151
3.1. Caracterització del model murí Wnt9a ^{-/-} en estadi post-natal 1 (P1).....	151
3.2. Anàlisi del pàncrees endocrí dels animals Wnt9a ^{-/-} a l'estadi embrionari (e)18.5	153
3.3. Anàlisi del pàncrees endocrí dels animals Wnt9a ^{-/-} a l'estadi embrionari (e)15.5	155
3.3.1. Estudi de l'expressió gènica pancreàtica en animals Wnt9a ^{-/-} a estadi embrionari (e)15.5.....	156
3.3.2. Anàlisi morfològica del pàncrees endocrí en animals Wnt9a ^{-/-} a l'estadi (e)15.5 ...	160
3.4. Estudi de la proliferació del compartiment endocrí a l'estadi (e)18.5.....	161

3.5. Anàlisi del metabolisme de la glucosa en animals Wnt9a ^{+/-}	163
<u>V. DISCUSSIÓ</u>	165
<u>VI. RESUM I CONCLUSIONS</u>	183
<u>VII. BIBLIOGRAFIA</u>	187
ANNEX	205
ARTICLE	213

ÍNDEX FIGURES I

TAULES

FIGURES

Figura 1. Anatomia del pàncrees humà.....	4
Figura 2. Tipus cel·lulars presents en l'illot i distribució d'un illot de ratolí abans i després de la identificació de les cèl·lules èpsilon (ϵ).....	5
Figura 3. Distribució cel·lular dels illots pancreàtics de diferents espècies.....	6
Figura 4. Possibles fonts i estratègies per a generar noves cèl·lules β	13
Figura 5. Progressió del desenvolupament pancreàtic en el ratolí.....	15
Figura 6. Cascada de factors de transcripció que participen en l'organogènesi pancreàtica del ratolí.....	19
Figura 7. Representació del procés d'inhibició lateral que té lloc en el procés de diferenciació, mediat per la cascada de senyalització Notch.....	23
Figura 8. Representació de les tres transicions i l'expressió de Neurogenina3 durant el desenvolupament del pàncrees en ratolí.....	25
Figura 9. Neurog3 inicia el programa transcripcional endocrí en les cèl·lules ductals de ratolí.....	28
Figura 10. Expressió del mRNA de <i>Math6</i> en diferents teixits de ratolí en etapa embrionària.....	31
Figura 11. Els factors de transcripció Pax4 i Arx competeixen per a la determinació del destí cel·lular entre els llinatges α /PP o β / δ	33
Figura 12. Representació esquemàtica del conjunt de vies de senyalització principals que intervenen en l'organogènesi pancreàtica en les diferents etapes de formació de l'òrgan.....	38
Figura 13. Esquema de les diferents vies de senyalització Wnt descrites: Wnt/ β -catenina, Wnt/ Ca^{2+} i Wnt/PCP.....	41
Figura 14. Morfologia pancreàtica dels diferents models transgènics emprats en els cinc estudis mencionats.....	48
Figura 15. Estadis principals de l'organogènesi pancreàtica i la participació de la via Wnt/ β -catenina en cadascun d'ells.....	51

Figura 16. Conservació de Wnt9a en vertebrats	55
Figura 17. Esquema de construcció dels dos models transgènics de Wnt9a	57
Figura 18. Imatge dels animals control (<i>Wnt9a</i> ^{+/+}) i els animals deficients en Wnt9a (<i>Wnt9a</i> ^{lacZ/lacZ})	58
Figura 19. Gràfica d'amplificació d'una PCR a temps real	70
Figura 20. Revelat d'un gel on la primera columna és un RNA totalment degradat i el de la segona té una qualitat molt superior	87
Figura 21. Electroforograma d'una mostra d'illots amb gran integritat	88
Figura 22. Representació esquemàtica de com distribuir les diferents dilucions en una placa de 96 pouets	92
Figura 23. Esquema de muntatge d'un casset de transferència	96
Figura 24. Esquema de muntatge de les morfometries	102
Figura 25. Esquema del muntatge d'imatges per a la morfometria	107
Figura 26. Comprovació per qRT-PCR i presència en pàncrees embrionari d'alguns gens diferencialment expressats en el <i>microarray</i>	121
Figura 27. Activació de la via de senyalització Wnt per Neurog3 i Math6	123
Figura 28. Regulació de l'expressió dels lligands Wnt9a i Wnt7b per Neurog3 i Math6	126
Figura 29. Expressió en teixits embrionaris dels lligands Wnt7b i Wnt9a	128
Figura 30. Expressió en pàncrees embrionari dels lligands Wnt7b i Wnt9a	129
Figura 31. Expressió en línies cel·lulars dels lligands Wnt7b, Wnt9a i Wnt5a	130
Figura 32. Sistema digestiu a e15.5 tenyit amb X-Gal	131
Figura 33. Detecció de β-Galactosidasa amb un anticòs específic en pàncrees d'animals transgènics per Wnt9a a estadi de desenvolupament e15.5	132
Figura 34. Corbes dosi-resposta i temps-resposta	133
Figura 35. Expressió de Wnt9a en resposta a Neurog3	134

Figura 36. Estudi dels canvis a la cromatina del gen <i>Wnt9a</i> en resposta a Neurog3	135
Figura 37. Estudi de l'estat de la cromatina en pàncrees embrionari.....	136
Figura 38. Regulació del gen de <i>Wnt9a</i> per factors bHLH	137
Figura 39. Regulació del gen de <i>Wnt9a</i> per factors de transcripció de la cascada endocrina	138
Figura 40. Comprovació de la sobreexpressió de <i>Wnt9a</i>	141
Figura 41. Estudi de l'efecte de la sobreexpressió de <i>Wnt9a</i> sobre la cascada endocrina en resposta a Neurog3	142
Figura 42. Estudi de l'efecte de la sobreexpressió de <i>Wnt9a</i> sobre l'expressió de <i>Wnt7b</i>	143
Figura 43. Activació de la via de senyalització Wnt/ β -catenina pel lligand <i>Wnt9a</i>	145
Figura 44. Creació de línies cel·lulars (clons) estables per a <i>Wnt9a</i>	146
Figura 45. Activació de la via de senyalització Wnt pel lligand <i>Wnt9a</i>	147
Figura 46. Regulació dels nivells de β -catenina per <i>Wnt9a</i>	148
Figura 47. Regulació dels nivells proteics de Tcf712 en resposta a Neurog3 i <i>Wnt9a</i>	149
Figura 48. Estudi del fenotip dels animals deficientes en <i>Wnt9a</i> a estadi post-natal 1 (P1)	152
Figura 49. Contingut total d'insulina dels pàncrees dels animals deficientes en <i>Wnt9a</i> a estadi post-natal 1 (P1).....	153
Figura 50. Tinció per les hormones pancreàtiques majoritàries a estadi e18.5 dels animals deficientes en <i>Wnt9a</i>	154
Figura 51. Estudi del fenotip dels animals deficientes en <i>Wnt9a</i> a estadi de desenvolupament e18.5	155
Figura 52. Expressió gènica a estadi de desenvolupament e15.5 del lligand <i>Wnt9a</i> i del factor pro-endocrí Neurog3.....	156
Figura 53. Expressió gènica de marcadors endocrins en els animals deficientes en <i>Wnt9a</i> a estadi de desenvolupament e15.5.....	157

Figura 54. Expressió gènica de les hormones endocrines del pàncrees en els animals deficients en Wnt9a a estadi de desenvolupament e15.5	157
Figura 55. Expressió gènica de marcadors exocrins en els animals deficients en Wnt9a a estadi de desenvolupament e15.5.....	158
Figura 56. Expressió gènica de gens de la via de Wnt en els animals deficients en Wnt9a a estadi de desenvolupament e15.5	159
Figura 57. Expressió gènica de gens de la via de Notch en els animals deficients en Wnt9a a l'estadi de desenvolupament e15.5.....	159
Figura 58. Tinció per les hormones pancreàtiques majoritàries a estadi e15.5 dels animals deficients en Wnt9a.....	160
Figura 59. Estudi del fenotip dels animals deficients en Wnt9a a estadi de desenvolupament e15.5	161
Figura 60. Estudi de la proliferació en estadi de desenvolupament e18.5	162
Figura 61. Pes corporal, nivells basals de glucosa i test de tolerància a la glucosa en animals Wnt9a adults salvatges i heterozigots.....	164
Figura 62. Esquema representatiu del procés de diferenciació endocrina on hi intervé Neurog3.....	168

TAULES

Taula 1. Gens associats a la diabetis tipus 2	10
Taula 2. Visió general d'alguns dels factors de transcripció que governen el desenvolupament i la formació de les cèl·lules β del pàncrees, juntament amb els fenotips dels models genètics de ratolí per aquests factors	17
Taula 3. Fenotips dels mutants per a cada un dels lligands de la via Wnt.....	53
Taula 4. Línies cel·lulars i medis de cultiu utilitzats durant la tesi	65
Taula 5. Gens implicats en la via de senyalització Wnt que són regulats de manera significativa per Neurog3 i/o shMath6.....	118

Taula 6. Resultats obtinguts amb el software de Genomatix pel promotor de <i>Wnt9a</i>	139
Taula 7. Glicèmies i insulinèmies dels animals deficients en <i>Wnt9a</i> a estadi post-natal 1 (P1).....	152

ABREVIACIONES

Actb	→ Actina
APS	→ Amonium persulfate (persulfat d'amoni)
Arx	→ Aristaless related homeobox
bHLH	→ Basic helix-loop-helix
BrdU	→ Bromodeoxiuridina
BSA	→ Bovine Serum Albumine (Albúmina de sèrum boví)
cDNA	→ Àcid desoxirribonucleic complementari
CoIP	→ Coimmunoprecipitació
Ct	→ Cycle threshold (cicle llindar)
DM1	→ Diabetes Mellitus tipus 1
DM2	→ Diabetes Mellitus tipus 2
DMEM	→ Dulbecco's modified eagle medium (medi d'àguila modificat per Dulbecco)
DMSO	→ Dimetil sulfòxid
DNA	→ Àcid desoxirribonucleic
DNasa	→ Deoxirribonucleasa
dNTP	→ Deoxyribonucleotide triphosphate (deoxinucleòtids trifosfats)
DPBS	→ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (solució salina tamponada de fosfats de Dulbecco)
DTT	→ Ditiotretitol
ECL	→ Enhanced chemiluminescence (quimioluminiscència augmentada)
EDTA	→ Àcid Etilen-Diamino-Tetraacètic
ELISA	→ Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay (assaig per immunoabsorció lligat a enzims)
FBS	→ Fetal Bovine Serum (Sèrum boví fetal)
Fgf	→ Fibroblast Growth Factor (factor de creixement fibroblàstic)
Fzd	→ Frizzled
Gcg	→ Glucagó
Gck	→ Glucoquinasa
GWAS	→ Genome-wide association studies (estudis d'associació del genoma a gran escala)
HBSS	→ Hank's Balanced Salt Solution (Solució equilibrada de salts de Hank)
HEK-293	→ Human epithelial kidney-293 (cèl·lules epitelials de ronyó humà-293)
Hes1	→ Hairy and enhancer of split 1
Hh	→ Hedgehog
Hlx9	→ Homeobox protein HB9
HNF1a	→ Hepatocyte nuclear factor 1a
HNF4a	→ Hepatocyte nuclear factor 4a
HNF4b	→ Hepatocyte nuclear factor 4b
HRP	→ Horseradish peroxidase (peroxidasa de rabe picant)
IgG	→ Immunoglobulina de tipus G
Ins	→ Insulina
IPGTT	→ Intraperitoneal glucose tolerance test (test de tolerència a la

	glucosa intraperitoneal)
IPTG	→ Isopropil β -D-1 tiogalactopiranòsid
Kb	→ Kilobases
KO	→ Knock-out (gen anul·lat)
LB	→ Lysogeny broth (caldo de lisogènia)
Lrp	→ Lipoprotein receptor-related protein
Math6	→ Mouse athonal homolog 6
MetOH	→ Metanol
MgCl₂	→ Clorur de magnesi
mGus	→ Mouse Glucuronidase
MODY	→ Maturity-onset diabetes of the young (diabetis de comportament adult que es presenta en joves)
MOI	→ Multiplicity of infection
MOPS	→ 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
mPAC	→ Murine AdenoPancreatic Carcinoma (cèl·lules d'un adenocarcinoma pancreàtic de ratolí)
NaCl	→ Clorur Sòdic
NaF	→ Sodium Flouride (Fluorur de sodi)
NaHCO₃	→ Carbonat sòdic
NaOH	→ Hidròxid sòdic
Neurod1/Beta2	→ Neurogenic differentiation factor 1/Beta-cell E-box transcriptional activator 2
Neurog3	→ Neurogenin 3
NFDM	→ Non-Fat Dried Milk
NIH-3T3	→ Mouse embryonic fibroblast (fibroblasts embrionaris de ratolí)
Nkx2.2	→ NK2 transcription factor related, locus 2
Nkx6.1	→ NK6 homeobox 1
NP-40	→ Nonidet P-40
Pax4	→ paired box gene 4
Pb	→ Parells de bases
PCI	→ Fenol:chloroform:isoamil alcohol
pCMV	→ Promotor de citomegalovirus
PCP	→ Plannar cell polarity (polaritat cel·lular)
PCR	→ Polymerase Chain Reaction (reacció en cadena de la polimerasa)
PDX1	→ Pancreatic and duodenal homeobox 1
PFA	→ Paraformaldehyde
PFU	→ Plate Forming Units
PP	→ Polipèptid pancreàtic
Ptf1a	→ Pancreas-specific transcription factor 1
PVDF	→ Polyvinilidene fluoride (flurorur de polividè)
RIP	→ Rat insulin promoter (promotor d'insulina de rata)
RNA	→ Àcid ribonucleic
RNasa	→ Ribonucleasa
SDS	→ Sodium Dodecil Sulfate (Dodecil sulfat sòdic)

SDS program →	Sequence detection system (sistema de detecció de seqüències)
SDS-PAGE →	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (electroforesi en gel de poliacrilamida amb Dodecil sulfat sòdic)
SEM →	Standard Error Mean (mitjana de l'error estàndard)
Sfrp →	Secreted frizzled-related protein
shRNA →	Short hairpin RNA (RNA de llaç curt)
siRNA →	Small interference RNA (RNA petit d'interferència)
Sox9 →	SRY-box containing gene 9
Sst →	Somatostatina
TAE →	Tris, acètic, EDTA
Tbp →	Tata-Box binding protein
TBS →	Tris Buffered Saline (Tampó salí de Tris)
TBS-T →	Tampó salí de Tris amb tween
Tcf712 →	Transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)
TCID50 →	50% tissue culture infective dose (50% dosi infectiva en cultiu cel·lular)
TEMED →	N, N, N', N'- tetrametiletildiamida
Tgf-β →	Transforming Growth Factor beta (factor de creixement transformant beta)
TMB →	Tetrametilbenzidina
UV →	Llum ultraviolada
Wnt →	Wingless
Wnt3a →	Wingless-type MMTV integration site family, member 3A
Wnt5a →	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
Wnt7b →	Wingless-type MMTV integration site family, member 7B
Wnt9a →	Wingless-type MMTV integration site family, member 9A
Wnt9b →	Wingless-type MMTV integration site family, member 9B
Wt →	Wild-type (salvatge)
X-Gal →	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósid
β-Gal →	β-galactosidasa

I. INTRODUCCIÓ

1. EL PÀNCREES I LA DIABETIS MELLITUS

1.1 EL PÀNCREES

El pàncrees és una glàndula amb una funció dual, tant endocrina com exocrina. El pàncrees exocrí està format per teixit acinar i teixit ductal i la seva funció és la de secretar enzims digestius pancreàtics cap al duodè. Aquest teixit constitueix aproximadament el 80-85% del total de la massa pancreàtica (Clark, 2004). Per altra banda, el pàncrees endocrí produeix i secreta hormones al torrent circulatori amb la funció de mantenir l'homeòstasi de la glucosa. Entre aquestes hormones endocrines destaquem com a hormones majoritàries la insulina, el glucagó i la somatostatina. El compartiment endocrí representa entre el 2 i el 5% del total de la massa pancreàtica. Al 1889 Von Mering i Minkowski van descriure la relació que existia entre el pàncrees i el control del metabolisme de la glucosa, observant que l'extracció d'aquest òrgan a un gos donava com a resultat l'aparició de diabetis.

El pàncrees va ser identificat per primera vegada per Herophilus (335-280 a. dC.), un anatomista i cirurgià grec. El terme *pankreas* prové del grec pan- (tot) i -kreas (carn), probablement degut a la consistència carnosa i homogènia de l'òrgan.

Anatòmicament, el pàncrees està format per tres compartiments: el cap del pàncrees que està adjacent al duodè, el cos que n'és la part central i, finalment, la cua que és la zona més propera a la melsa (veure figura 1).

1.1.1. PÀNCREES EXOCRÍ

El pàncrees exocrí està format per les cèl·lules acinars, que estan agrupades en estructures que s'anomenen acinis. En el citoplasma de les cèl·lules acinars trobem grànuls secretors que contenen els enzims digestius (proteases, amilases, lipases, nucleases, etc.). Aquests enzims són secretats com a precursors i són activats pel procés de proteòlisi en el duodè.

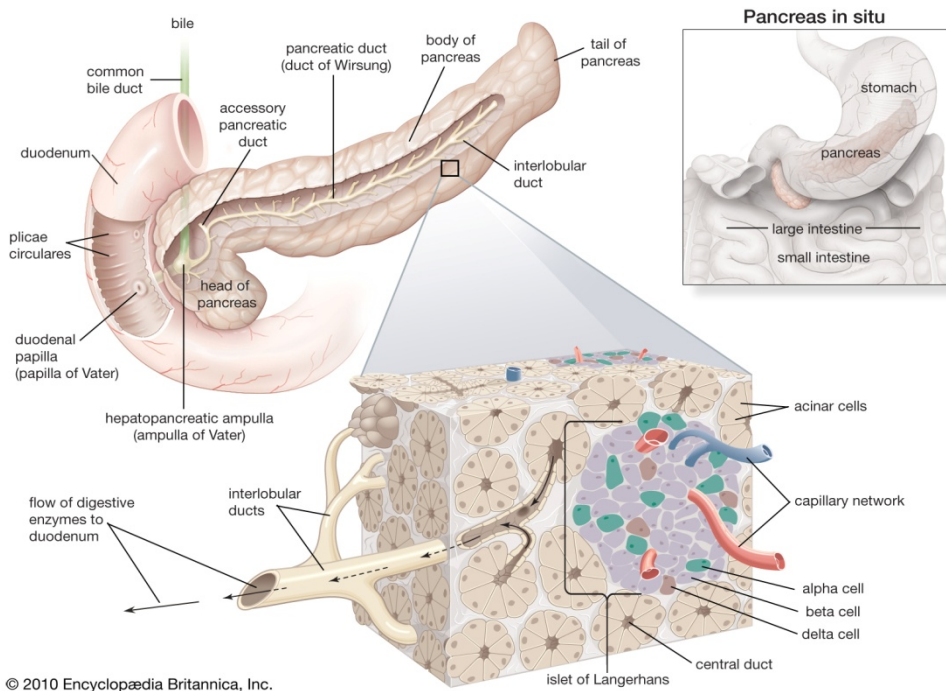


FIGURA 1. Anatomia del pàncrees humà. (Encyclopedia Britannica, 2010)

Aquestes secrecions pancreàtiques són portades fins al lumen dels acins i s'acumulen en els ductes intralobulars. Les cèl·lules ductals representen una part molt petita del pàncrees adult i tenen la funció de conduir els suc pancreàtic fins al duodè. A més, les cèl·lules ductals secreten bicarbonat amb la funció de neutralitzar l'acidesa del suc pancreàtic. Aquestes cèl·lules s'han proposat com a possible font de cèl·lules precursoras de les cèl·lules β (revisat a (Gräpin-Botton, 2005))

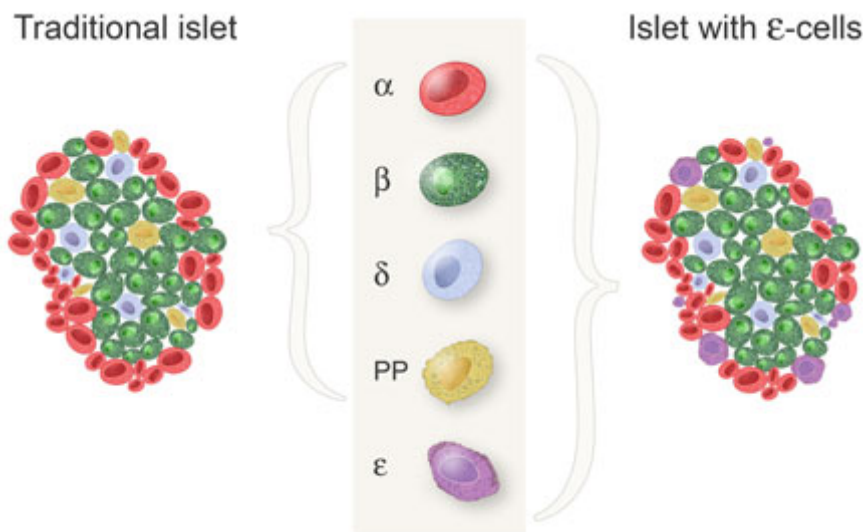
1.1.2. **PÀNCREES ENDOCRÍ**

La unitat funcional del pàncrees endocrí són els illots de Langerhans, que van ser descrits per primera vegada per Paul Langerhans (1869), motiu pel qual es coneixen per aquest nom.

Els illots de Langerhans són agrupacions de cèl·lules endocrines que estan repartides enmig del compartiment exocrí. Podem trobar al voltant d'un milió d'illots en un pàncrees humà, adult i sa. Les hormones secretades directament al torrent sanguini, provinents dels illots de Langerhans, són produïdes per cinc tipus de

cèl·lules diferents: les cèl·lules alpha (α) que produeixen glucagó, les cèl·lules beta (β) que produeixen insulina, les cèl·lules delta (δ) que produeixen somatostatina, les cèl·lules PP que produeixen polipèptid pancreàtic i, recentment s'ha descrit la presència d'un altre tipus cel·lular, les cèl·lules èpsilon (ϵ) (Prado et al., 2004; Wierup et al., 2004), que produeixen grelina (veure figura 2).

En els illots trobem majoritàriament cèl·lules β que constitueixen aproximadament el 70-80% del total de la massa de l'illot, seguides per les cèl·lules α que ocupen aproximadament un 20% i, finalment, la resta de cèl·lules δ , PP i ϵ que conformen menys del 15% de la massa total de l'illot. Aquesta composició es manté més o menys homogènia en tot l'òrgan, tot i que s'ha descrit que la part posterior del cap del pàncrees és especialment rica en cèl·lules PP (Orci et al., 1976).



© 2005 Beta Cell Biology Consortium, Illustration by JP Cartailier

FIGURA 2. Tipus cel·lulars presents en l'illot i distribució d'un illot de ratolí abans i després de la identificació de les cèl·lules èpsilon (ϵ) (Beta cell Biology Consortium).

Les cèl·lules de l'illot s'organitzen de manera diferent segons l'espècie. Així, els illots murins es caracteritzen per un nucli central de cèl·lules β envoltat de cèl·lules no β (cèl·lules α , δ , PP i ϵ) situades a la perifèria, mentre que en els illots humans

aquesta distribució no és tan homogènia, ja que podem trobar cèl·lules no β en la part central de l'illot (veure figura 3).

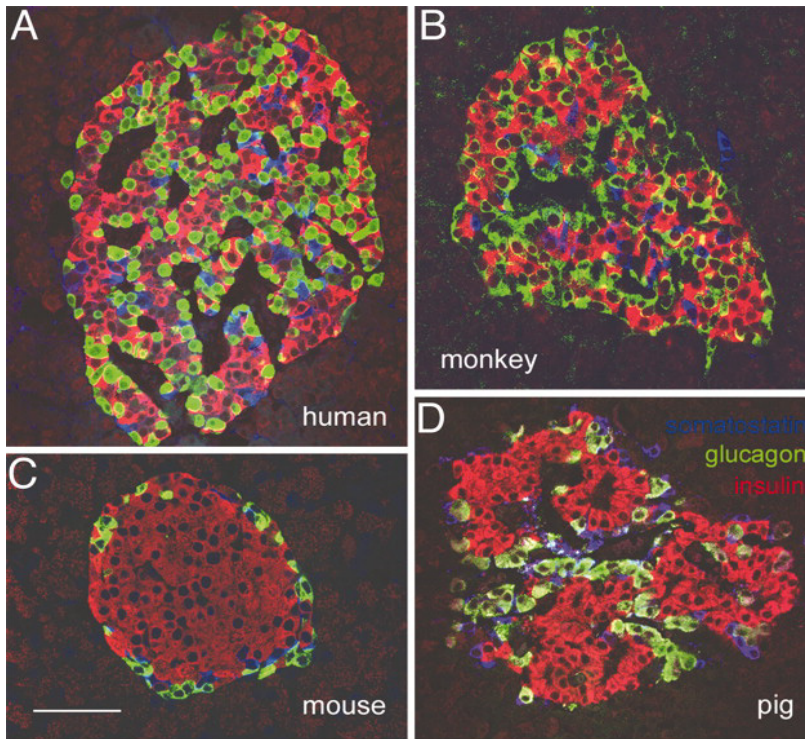


FIGURA 3. Distribució cel·lular dels illots pancreàtics de diferents espècies. Distribució cel·lular dels illots pancreàtics de diferents espècies (A) Humans, (B) primat, (C) ratolí i (D) porc. La insulina està marcada en vermell, el glucagó en verd i la somatostatina en blau (Cabrera et al., 2006).

1.1.2.1 La cèl·lula β i la secreció d'insulina

La secreció adequada d'insulina per part de les cèl·lules β de l'illot pancreàtic és clau per al bon control de la glucèmia.

La insulina és sintetitzada en el reticle endoplasmàtic, processada i emmagatzemada en grànuls secretors esperant ser alliberada al torrent sanguini en resposta a estímuls nutricionals, el principal dels quals és la glucosa. La secreció de la insulina és un procés complex i molt controlat. A mode de resum, quan hi ha un augment en els nivells circulants de glucosa, aquesta entra dins del citoplasma de la cèl·lula β mitjançant el transportador de glucosa, Glut-2. La glucosa es metabolitza pel procés de la glicòlisi generant un augment del ratio citoplasmàtic ATP/ADP, provocant

que el canal de potassi (K^+)- dependent d'ATP de la membrana de la cèl·lula β es tanqui. Això provoca la despolarització de la membrana citoplasmàtica, permetent que els canals de calci (Ca^{2+})- dependents de voltatge, s'obrin, fet que facilita l'entrada de calci dins de la cèl·lula induint l'exocitosi dels grànuls secretors d'insulina (revisat a (Rorsman et al., 2003)).

1.2 LA DIABETIS MELLITUS

La diabetis mellitus (DM), segons l'Associació Americana de Diabetis (ADA, American Diabetes Association), és un grup de malalties metabòliques que es caracteritzen per nivells elevats de glucosa en sang com a resultat de la incapacitat del cos de produir o utilitzar la insulina.

La Federació Internacional de Diabetis (IDF, International Diabetes Federation) ha estimat que al voltant de 300 milions de persones de tot el món tenen diabetis, i una prevalença del 6,6% en el grup d'edat comprès entre 20 i 79 anys. S'espera que aquest número s'incrementi més del 50% en els pròxims 20 anys. Pel 2030 s'ha calculat que 438 milions de persones estaran afectades per diabetis o una prevalença del 7,8%. Cada any, més de 7 milions de persones desenvolupen diabetis. En els països més desenvolupats, la diabetis és la quarta o cinquena causa de mort i les complicacions de salut que se'n deriven tenen enormes costos econòmics. Definitivament, la diabetis és un dels problemes de salut més importants del segle XXI (www.idf.org).

1.2.1. CLASSIFICACIÓ DE LA DIABETIS

D'acord amb els criteris actuals de classificació per part de l'Associació Americana de Diabetis (ADA), la Diabetis Mellitus es classifica segons les bases de l'etiologia i els símptomes clínics en:

1.2.1.1. *Diabetis mellitus tipus 1 (DM1)*

Aquest tipus de diabetis representa el 5-10% del total de casos de diabetis. La DM1 és deguda a una destrucció de les cèl·lules productores d'insulina del pàncrees, com a causa d'una reacció autoimmune, i les cèl·lules β romanents produeixen molt poca insulina o directament no en produeixen, disminuint així la capacitat de captar glucosa per part dels teixits perifèrics i provocant l'aparició d'hiperglucèmia.

La DM1 acostuma a aparèixer en nens o en joves, però també hi ha casos on apareix en l'edat adulta. Els símptomes de la DM1 són gran sensació de set i boca seca, micció freqüent, sensació de cansament o falta d'energia, sensació de gana constant, pèrdua de pes sobtada, lenta curació de ferides, infeccions recurrents, visió borrosa, etc. Els pacients tipus 1 necessiten l'administració d'insulina cada dia per tal de mantenir els nivells de glucosa controlats. En aquests pacients les injeccions d'insulina són vitals.

La DM1 té una etiologia multifactorial. Hi ha un component de susceptibilitat genètica clar, però també hi intervenen agents ambientals en l'aparició de la malaltia, ja que, menys del 10% dels individus amb predisposició genètica a la DM1 acaben desenvolupant aquesta malaltia (Knip et al., 2005). Els gens que contribueixen de manera més significativa a la susceptibilitat genètica a la DM1 es troben en la regió gènica del complex d'histocompatibilitat major (MHC, major histocompatibility complex), al cromosoma 6. Aquesta regió gènica determina al voltant del 40% dels casos familiars de diabetis (Paronen et al., 2004). Concretament, la susceptibilitat a la DM1 s'ha associat als gens de l'antigen leucocitari humà (HLA, Human Leucocyte Antigen) de classe I i II.

1.2.1.2. Diabetis Mellitus tipus 2 (DM2)

Aquest tipus de diabetis representa el 90-95% del total de casos de diabetis. La DM2 es caracteritza per una deficiència relativa en la secreció d'insulina acompanyada d'una resistència dels teixits perifèrics a l'acció d'aquesta hormona.

En la majoria de pacients tipus 2 inicialment n'hi ha prou amb un bon control dietètic, però hi ha casos en els que seran necessaris medicaments orals per al control de la hiperglucèmia, i en alguns casos més extrems pot ser necessària l'administració d'insulina, com en el cas dels diabètics tipus 1.

La DM2 acostuma a aparèixer en adults, després dels 40 anys, però pot aparèixer abans, especialment en poblacions amb una alta prevalença de diabetis. De tots els casos de diabetis, el 70% es registren en països econòmicament subdesenvolupats, sent l'Índia la que presenta la població diabètica més elevada, seguida per la Xina (www.idf.org).

De la mateixa manera que passa amb la DM1, la DM2 té una etiologia multifactorial en la que hi ha un fort component genètic però els hàbits i l'estil de vida juguen també un paper molt important. Factors de risc per al desenvolupament de la DM2 són la història familiar amb risc de patir diabetis, l'envelliment, l'obesitat o la dieta i la inactivitat física.

En els últims anys s'ha avançat molt en la recerca de factors genètics que puguin influenciar o associar-se a l'aparició de DM2 gràcies al desenvolupament dels estudis d'associació del genoma a gran escala (Genome-wide association studies, GWAS). Aquests tipus d'estudis han permès identificar com a mínim 40 *loci* candidats en la susceptibilitat a DM2 (Imamura and Maeda 2011) (veure taula 1).

Els estudis de GWAS també han permès validar gens que ja havien estat identificats prèviament amb altres metodologies com és el cas del gen *TCF7L2* (transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)). Aquest gen codifica per el factor de transcripció TCF7L2 (conegut anteriorment com TCF4) que és l'efector principal de la via de senyalització wntless (Wnt). Polimorfismes en el gen de *TCF7L2* es van associar al risc de patir DM2 per primera vegada l'any 2006, i des d'aleshores, diversos GWAS han validat aquesta associació i s'han publicat diversos estudis clínics i bàsics destinats a entendre la participació de TCF7L2 en l'aparició de la DM2. Tot i que mecanísticament es desconeix com aquests polimorfismes en les regions intròniques del gen *TCF7L2* afecten al risc de patir DM2, s'ha vist que aquest regulador transcripcional estimula la proliferació de les cèl·lules β , regula la secreció d'insulina, així com també estimula la secreció de la hormona incretina GLP-1 (glucagon-like peptide-1) per part de les cèl·lules L de l'intestí (Yi et al., 2005; Cauchi et al., 2007; Salonen et al., 2007; Sladek et al., 2007; Loder et al., 2008).

ANY	SÍMBOL	GEN	POLIMORFISME
2000	PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	mutació: Pro12Ala
2003	KCNJ11	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11	mutació: Glu23Lys
2006	TCF7L2	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	intrònic
2007	IGF2BP2	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	intrònic
	WFS1	Wolfram syndrome 1 (wolframin)	intrònic mutació: Arg611His
	CDKAL1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1	intrònic
	SLC30A8	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8	mutació: Arg325Trp
	CDKN2A/B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	125kb <i>upstream</i>
	HHEX	hematopoietically expressed homeobox	7.7kb <i>downstream</i>
	FTO	fat mass and obesity associated	intrònic
	HNF1B	HNF1 homeobox B	intrònic intrònic
2008	NOTCH2	Notch gene homolog 2	intrònic
	THADA	thyroid adenoma associated	mutació: Thr1187Ala
	ADAMSTS9	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 9	38kb <i>upstream</i>
	JAZF1	JAZF zinc finger 1	intrònic
	CDC123/ CAMK1D	cell division cycle 123 homolog/ calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID	regió intergènica
	KCNQ1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	intrònic (intró15) intrònic (intró15)
	TSPAN8/ LGR5	tetraspanin 8/ leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5	regió intergènica
2009	IRS1	insulin receptor substrate 1	502kb <i>downstream</i>
	MTNR1B	melatonin receptor 1B	intrònic intrònic
2010	PROX1	prospero-related homeobox 1	2kb <i>upstream</i>
	BCL11A	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	99kb <i>downstream</i>
	GCKR	glucokinase (hexokinase 4) regulator	intrònic
	ADCY5	adenylate cyclase 5	intrònic
	UBE2E2	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2	intrònic
	ZBED3	zinc finger, BED-type containing 3	41kb <i>upstream</i>
	DGKB/ TMEM195	diacylglycerol kinase, beta 90kDa/ alkylglycerol monoxygenase	regió intergènica
	GCK	glucokinase (hexokinase 4)	36kb <i>upstream</i>
	KLF14	Kruppel-like factor 14	47kb <i>upstream</i>
	TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	intrònic
	CHCHD9	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	234kb <i>upstream</i>

<i>CENTD2/ARAP1</i>	centaurin, delta 2/ ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 1	5'UTR
<i>KCNQ1</i>	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	intrònic (intró11)
<i>HMGA2</i>	high mobility group AT-hook 2	43kb <i>upstream</i>
<i>HNF1A</i>	HNF1 homeobox A	20kb <i>downstream</i>
<i>PRC1</i>	protein regulator of cytokinesis 1	intrònic
<i>ZFAND6</i>	zinc finger, AN1-type domain 6	1.5kb <i>downstream</i>
<i>C2CD4A/B</i>	C2 calcium-dependent domain containing 4B	regió intergènica
<i>DUSP9</i>	dual specificity phosphatase 9	8kb <i>upstream</i>

TAULA 1. Gens associats a la diabetis tipus 2. Llistat de gens associats a la DM2 mitjançant GWAS. En la taula s'especifica l'any d'identificació en la columna 1, i el polimorfisme identificat en la columna 2. Adaptat de (Imamura and Maeda, 2011).

1.2.1.3. Altres tipus de diabetis

Un altre tipus de diabetis són aquelles que s'associen a defectes monogènics que alteren la funció de la cèl·lula β , amb una herència autosòmica dominant. Es coneixen com les MODY (maturity-onset diabetes of the young). Les MODY es caracteritzen per l'aparició d'hiperglucèmia a una edat primerenca (abans dels 25 anys), defectes en la secreció d'insulina i absència dels anticossos típics de la DM1.

S'han descrit diferents tipus de MODY depenent del gen que està alterat, per exemple, en la MODY1 està mutat el gen *HNF4A*, en la MODY2 és el gen de la glucoquinasa (*GCK*, glucokinase), en el cas de la MODY3 és el gen *HNF1A* (hepatocyte nuclear factor 1 α) que està mutat, la MODY4 amb el gen *PDX1* (pancreatic and duodenal homeobox 1) alterat, la MODY5 que té la mutació en el gen *HNF4B* i la MODY 6 en el gen *NEUROD1/BETA2* (Neurogenic differentiation factor 1/Beta-cell E-box transcriptional activator 2) (Servitja et al., 2004). La majoria d'aquests gens són factors de transcripció que participen en el correcte desenvolupament del pàncrees i en la posterior funció d'aquest. Alguns d'ells seran presentats en la propera secció.

Hi ha altres tipus de diabetis, com per exemple la diabetis mellitus gestacional (DMG) que es detecta per primera vegada durant l'embaràs i que es defineix per qualsevol grau d'intolerància a la glucosa. Aquesta pot desaparèixer després de l'embaràs o pot persistir. Les dones que pateixen DMG tenen un risc més elevat de desenvolupar DM2 més endavant.

1.2.2. TERÀPIES PEL TRACTAMENT DE LA DIABETIS

- Administració d'insulina exògena

Actualment el tractament de la diabetis es basa en l'administració d'insulina exògena per tal de poder controlar els nivells de glucosa en sang, mitjançant injeccions diàries repetides o, més recentment, mitjançant l'ús d'una bomba d'insulina. A part de les molèsties que això implica als pacients, com un control periòdic de la glucèmia i injeccions repetides d'insulina al llarg del dia, aquest tractament no sempre és del tot eficaç per a tots els pacients, i en alguns casos aconseguir la normoglucèmia es fa extremadament difícil. En aquests casos, els pacients presenten períodes d'hipo i hiperglucèmies que portaran a la llarga a complicacions micro i macrovasculars severes, que poden provocar la mort. També cal recordar que les injeccions d'insulina no són una cura, sinó que són un tractament pal·liatiu dels símptomes de la diabetis.

- Transplantament de pàncrees o d'illots pancreàtics aïllats

Una possible cura per a la diabetis seria el reemplaçament de les cèl·lules β que s'han destruït o que tenen un mal funcionament per altres de funcionals. Una aproximació utilitzada ha estat el transplantament de pàncrees total o el transplantament d'illots pancreàtics aïllats, a partir de donants cadàver. Tot i que el transplantament de pàncrees es porta a terme amb èxit i els pacients no necessiten de l'administració exògena d'insulina, l'operació és molt agressiva per al pacient. El transplantament d'illots de donants, que es realitza seguint el protocol d'Edmonton (Shapiro et al., 2000), presenta també les seves limitacions. Per exemple, que hi ha un nombre molt limitat de donants tenint en compte la demanda que existeix. A més, el procés d'extracció d'illots és limitant perquè hi ha un baix rendiment, fet que implica la necessitat de més d'un donant per receptor. Els beneficiaris del transplantament d'illots serien una minoria, només aquells que presentin una simptomatologia molt severa i en els quals, els efectes secundaris de la immunosupressió crònica associada al transplantament siguin menys importants que la necessitat vital d'aquest.

No obstant, ambdues aproximacions demostren que el reemplaçament de les cèl·lules β en pacients diabètics pot portar a la cura d'aquesta malaltia.

- Medicina regenerativa

Les limitacions existents en el transplantament de pàncrees i de illots isolats han despertat l'interès dels investigadors pel camp de la medicina regenerativa. Aquesta disciplina es basa en generar cèl·lules madures de qualitat i en quantitat suficient per reemplaçar les cèl·lules destruïdes o no funcionals a causa d'una malaltia. En el cas de la diabetis, es treballa en la direcció de trobar noves fonts de cèl·lules productores d'insulina per restablir la massa de cèl·lules β perdudes durant la diabetis. S'han proposat diferents estratègies en medicina regenerativa com la formació de noves cèl·lules β per replicació a partir de cèl·lules β preexistents, la diferenciació a partir de cèl·lules mare embrionàries, a partir de cèl·lules troncales adultes, progenitors pancreàtics o no-pancreàtics, de cèl·lules troncales pluripotents induïdes (iPSC) o la transdiferenciació a partir d'altres tipus cel·lulars diferenciats, com les cèl·lules ductals, les cèl·lules acinars o els hepatòcits (Guo et al., 2009; Yechool et al., 2010) (veure figura 4).

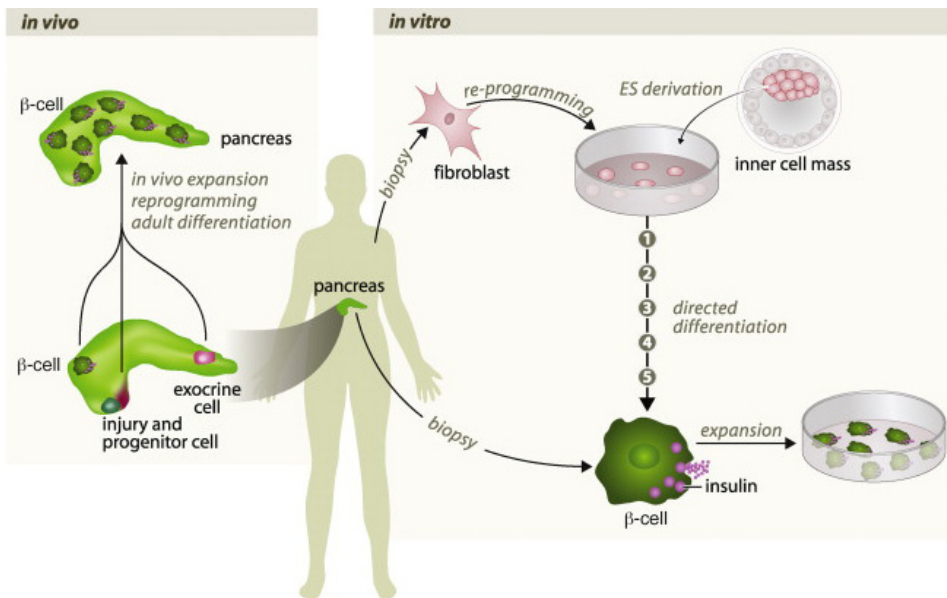


FIGURA 4. Possibles fonts i estratègies per a generar noves cèl·lules β (modificada de (Borowiak et al., 2009a)).

Una de les estratègies proposades per tal de generar noves cèl·lules β és seguir els passos que porten a la correcta formació d'aquestes. Per una banda, hi ha grups que s'han centrat en guiar el desenvolupament endocrí mitjançant l'estudi de les vies de senyalització que participen en el procés. Per exemple, el grup de Baetge EE ha generat un protocol que permet l'obtenció de cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules troncales embrionàries humanes (hESC), així com també cèl·lules que secreten glucagó, somatostatina, PP i grelina afegint diferents molècules de senyalització (D'Amour et al., 2006). Altres grups s'han centrat més en la utilització de diferents factors de transcripció claus per a la formació de cèl·lules β per dirigir la diferenciació de cèl·lules pluripotencials (Yechoor et al., 2009), o la transdiferenciació a partir de cèl·lules amb un llinatge diferent a la cèl·lula β , com per exemple les cèl·lules exocrines del pàncrees a les que se'ls afegeix una barreja de factors de transcripció concrets (Pdx1, Neurog3 i MafA) per al desenvolupament del llinatge cel·lular β (Zhou et al., 2008), i que porta a la generació de cèl·lules productores d'insulina.

El que sembla una condició imprescindible, per tal de poder generar noves cèl·lules β , és entendre i conèixer els mecanismes moleculars que controlen la progressió des d'una cèl·lula no diferenciada fins a una cèl·lula β adulta durant el desenvolupament normal de l'organisme. La potencial aplicabilitat dels coneixements derivats de la biologia del desenvolupament a protocols de medicina regenerativa ha suscitat l'interès sobre l'organogènesi pancreàtica d'investigadors dins del camp de la diabetis, i més concretament, en el programa de diferenciació endocrino-pancreàtica durant l'embriogènesi.

2. DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DEL PÀNCREES ENDOCRÍ

2.1 MORFOGÈNESI PANCREÀTICA

L'organogènesi pancreàtica és un procés complex i coordinat (veure figura 5). El pàncrees es forma a partir de la fulla embrionària endodèrmica, compartint origen embrionari comú amb altres òrgans com el fetge, l'intestí o el pulmó. L'especificació del pàncrees s'inicia al tub digestiu rudimentari a l'estadi embrionari (e)8.5 en el ratolí. Definim l'estadi e0.5 de desenvolupament com el moment en el què es detecta el tap vaginal. En els estadis primerencs de desenvolupament pancreàtic es poden observar dues parts ben diferenciades: el primordi pancreàtic dorsal que emergeix primer al voltant de e9.5, i el primordi pancreàtic ventral que és visible unes 12 hores després. Aquestes dues estructures, en emergir de bandes oposades del tub digestiu rudimentari, presenten diferències notables pel que fa a l'ambient que les envolta, les característiques espai-temporals, l'especificitat de les vies de senyalització o els perfils d'expressió gènica que guien el seu desenvolupament (Habener et al., 2005). Més endavant en el desenvolupament, cap a l'estadi e12.5, aquestes dues estructures entren en contacte i s'acaben fusionant per a formar l'òrgan adult.

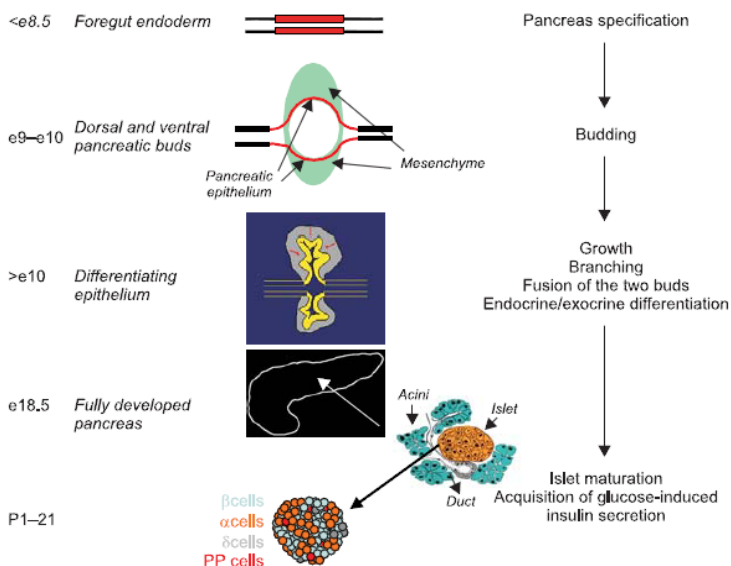


FIGURA 5. Progressió del desenvolupament pancreàtic en el ratolí (Gasa, 2005).

A partir de l'estadi e10.5, comença la ràpida proliferació de l'epiteli pancreàtic que es ramificarà tot envaint el mesènquima que l'envolta. Aquestes primeres etapes d'especificació pancreàtica es coneixen amb el nom de transició primària.

Al mateix temps que l'òrgan creix, s'iniciarà la diferenciació dels diferents llinatges cel·lulars pancreàtics. Tot i que les primeres cèl·lules que expressen glucagó ja es detecten a e9.5, i les que expressen insulina a e10.5, la població de cèl·lules endocrines en general, i en especial les cèl·lules β , no comença a créixer significativament fins l'estadi e13-e14. Aquest període d'expansió endocrina basada en la neoformació de cèl·lules endocrines a partir de progenitors pancreàtics es coneix amb el nom de transició secundària (Gasa, 2005). És en aquest moment quan les primeres cèl·lules positives per somatostatina comencen a aparèixer, de la mateixa manera que es comencen a formar els acinis primerencs que es diferenciarien en les cèl·lules exocrines del pàncrees.

Fins aquest moment, les cèl·lules endocrines estan dispersades en l'epiteli pancreàtic, i no és fins l'estadi e16.5 que les cèl·lules endocrines comencen a organitzar-se formant estructures agrupades semblants als illots madurs. D'aquí en endavant, s'establiran connexions entre les cèl·lules endotelials i les cèl·lules endocrines que permetran l'angiogènesi en els illots, molt important per a la funcionalitat dels illots adults. Aquests però, no es formaran fins al final del desenvolupament, patint reorganitzacions fins les 2-3 setmanes després del naixement (transició terciària).

2.2 CONTROL TRANSCRIPCIONAL DEL DESENVOLUPAMENT PANCREÀTIC

El programa de diferenciació que permet la formació d'una cèl·lula endocrina madura a partir d'una cèl·lula precursora pluripotent, comprèn una seqüència ordenada de canvis en els perfils d'expressió gènica, que són regulats per factors de transcripció específics (Jensen, 2004).

GEN	INICI	EXPRESSIÓ I FUNCIONS	FENOTIP PANCREÀTIC DELS MODELS GEN ANUL·LATS DE RATOLÍ
<i>Foxa2</i> <i>aka Hnf3β</i>	≤e5.5	Expressat al llarg de l'endoderm pancreàtic primerenc; restringit a les cèl·lules acinars i endocrines al final de la gestació; necessari per a la funcionalitat de l'illot	<i>Foxa2</i> ^{-/-} : letal embrionari; absència de l'endoderm de l'intestí anterior. <i>Foxa3-Cre</i> ; <i>Foxa2</i> ^{fl/fl} : hipoglicèmia; hipoglucagonèmia; pèrdua de cèl·lules α. <i>Ins-Cre</i> ; <i>Foxa2</i> ^{fl/fl} : hipoglicèmia hiperinsulinèmic
<i>Hnf6</i> <i>aka Onecut1</i>	≤e9.0	Expressat en les cèl·lules MPCs i es restringeix a les cèl·lules acinars i ductals; és necessari per a la diferenciació endocrina	<i>Hnf6</i> ^{-/-} : hipoplàsia del pàncrees ventral i dorsal que es manté en estadi post-natal, per una expressió de Pdx1 retardada; pèrdua de progenitors endocrins Ngn3 ⁺ ; reducció en el nombre de cèl·lules endocrines
<i>Hb9</i> (del gen <i>Hlxb9</i>)	≤e8.0	Endoderm de l'intestí anterior i mig, i més endavant en primordis pancreàtics dorsal i ventral; es restringeix a la cèl·lula β. És necessari per al desenvolupament del pàncrees dorsal i la diferenciació final de la cèl·lula β	<i>Hlxb9</i> ^{-/-} : agènesi de pàncrees dorsal; reducció en el nombre de cèl·lules β en pàncrees ventral, que també té disminució de l'expressió de Glut2 i Nkx6.1; augment de cèl·lules δ
<i>Hnf1β</i> <i>aka Tcf2</i> <i>aka vHnf1</i>	≤e8.5	Expressat en les cèl·lules MPCs; necessari per al creixement dels primordis pancreàtics	<i>Hnf1β</i> ^{-/-} : pàncrees ventral indetectable; pàncrees dorsal aturada del creixement ≥e10.5 i pèrdua cap a e13.5 degut a una menor proliferació
<i>Isl1</i>	≤e9.0	Expressat en el mesènquima dorsal pancreàtic i en cèl·lules endocrines. Necessari per al creixement de l'epiteli pancreàtic i per a la diferenciació endocrina. Necessari per a la maduració, proliferació i supervivència en la transició secundària	<i>Isl1</i> ^{-/-} : absència del mesènquima dorsal pancreàtic i diferenciació exocrina defectiva; aturada de la diferenciació exocrina degut a la seva funció en les cèl·lules epitelials. <i>Pdx1-Cre</i> ^{late} ; <i>Isl1</i> ^{fl/fl} : hiperglicèmia; hipoplàsia de l'illot; nombre reduït de progenitors tardans Pax6 ⁺ ; disminució de proliferació i increment de l'apoptosi de cèl·lules endocrines; maduració de cèl·lules endocrines descompensada
<i>Pdx1</i>	e8.5–e8.75	Expressat en les cèl·lules MPCs i després a les cèl·lules β; necessari per al creixement dels primordis pancreàtics	<i>Pdx1</i> ^{-/-} : agènesi de pàncrees ventral; pàncrees dorsal aturada del creixement ≥e10.5. <i>Pdx1</i> ^{+/+} : intolerància a la glucosa, GISIS alterat; augment de susceptibilitat a apoptosi de cèl·lula β
<i>Ptf1a</i>	e8.5–e8.75	Expressat en les cèl·lules MPCs i després a les cèl·lules acinars; promou el destí pancreàtic ventral i guia el programa acinar	<i>Ptf1a</i> ^{-/-} : agènesi de pàncrees ventral (les cèl·lules adopten destí intestinal i CBD); pàncrees dorsal aturada del creixement ≥e10.5; en pàncrees dorsal, cèl·lules endocrines presents, però pèrdua de les acinars
<i>Hes1</i>		Manté les cèl·lules MPCs prevenint la sortida de cicle i la diferenciació reprimint Ngn3 i p57, respectivament	<i>Hes1</i> ^{-/-} : hipoplàsia de pàncrees dorsal i ventral degut a una reducció del conjunt de cèl·lules MPCs per una diferenciació prematura; disgènesi acinar; pàncrees ectòpic en l'estómac distal, duodè i CBD

<i>Sox9</i> ≤e9.0	Expressat en les cèl·lules MPCs; necessari per al creixement dels primordis pancreàtics i la generació de progenitors endocrins <i>Ngn3</i> ⁺	<i>Pdx1-Cre</i> ^{early} ; <i>Sox9</i> ^{fl/fl} : hipoplàsia de pàncrees dorsal i ventral degut a una reducció del conjunt de cèl·lules MPCs; increment de l'apoptosi, reducció de la proliferació i diferenciació prematura <i>Pdx1-Cre</i> ^{early} ; <i>Sox9</i> ^{fl/+} : hipoplàsia de l'illot degut a una disminució en el nombre de cèl·lules progenitores <i>Ngn3</i> ⁺
<i>Nkx6.1</i> ≤e9.0	Expressat en les cèl·lules MPCs, progenitors endocrins <i>Ngn3</i> ⁺ , i després cèl·lules β. Especificació de MPCs a través d'un destí endocrí/ductal. Necessari per la diferenciació de la cèl·lula β	<i>Nkx6.1</i> ^{-/-} : 85% de reducció en el nombre de cèl·lules β; pèrdua addicional de cèl·lules α en mutants <i>Nkx6.1</i> ^{-/-} ; <i>Nkx6.2</i> ^{-/-} . <i>Nkx6.1</i> ^{-/-} : expressió troncal ectòpica de <i>Ptf1a</i> i pèrdua de cèl·lules <i>Ngn3</i> ⁺ ; ambdós més accentuats en animals <i>Nkx6.1</i> ^{-/-} ; <i>Nkx6.2</i> ^{-/-}
<i>Nkx6.2</i> ≤e10.5	Expressat en cèl·lules MPCs, i després a e15.5, només en algunes cèl·lules glucagó ⁺ i acinars. Funcionalment equivalent a <i>Nkx6.1</i>	<i>Nkx6.2</i> ^{-/-} : cap fenotip pancreàtic obvi
<i>Ngn3</i> ≤e9.5	Marcador de cèl·lula endocrina progenitora, i després expressat en cèl·lules de l'illot. Indueix a les cèl·lules d'una manera autònoma cap a llinatge endocrí; necessari per a la formació de totes les cèl·lules endocrines. Manté la funció endocrina	<i>Ngn3</i> ^{-/-} : absència de totes les cèl·lules pancreàtiques endocrines i les enteroendocrines; dismorfogènesi acinar; cap a llinatge endocrí; necessari per <i>Ins2-Cre</i> ; <i>Ngn3</i> ^{-/-} : hiperglicèmia; maduració de la cèl·lula β descompensada
<i>la1</i> aka <i>Insm1</i> ≤e9.5	Expressat en progenitors endocrins i en algunes cèl·lules endocrines diferenciades d'una manera <i>Ngn3</i> -dependent	<i>la1</i> ^{-/-} : diferenciació descompensada de cèl·lules α i β, i de cèl·lules enteroendocrines
<i>Neuro D1</i> aka <i>Beta2</i> ≤e9.5	Expressat en cèl·lules en diferenciació i en cèl·lules endocrines madures. Necessari per una formació normal de l'illot, i per a l'adquisició i manteniment del fenotip responedor a glucosa de les cèl·lules β	<i>NeuroD1</i> ^{-/-} : hipoplàsia de l'illot i disgènesi, apoptosi endocrina i diferenciació aberrant; diferenciació enteroendocrina interrompuda. <i>RIP-Cre</i> (or <i>Pdx1-Cre</i> ^{ERT}); <i>NeuroD1</i> ^{fl/fl} : hiperglicèmia; insulina pancreàtica disminuïda (mRNA <i>ins1</i> disminuït); immaduresa de cèl·lula β
<i>Nkx2.2</i> ≤e9.5	Expressat en cèl·lules MPCs, i després en cèl·lules α, β i PP. Necessari per al desenvolupament de cèl·lules β i α	<i>Nkx2.2</i> ^{-/-} : pèrdua de cèl·lula β, α i PP; expansió de cèl·lula ε.
<i>Pax4</i> ≤e9.5	Expressat en progenitors endocrins, i després es restringeix a cèl·lules β i δ; expressió dependent de <i>Ngn3</i> . Promou l'assignació a destí cel·lular β	<i>Pax4</i> ^{-/-} : pèrdua de cèl·lules β i δ; expansió de cèl·lules ε i α
<i>Arx</i> ≤e9.5	Expressat en cèl·lules α i PP de manera <i>Ngn3</i> -dependent; promou l'adquisició del destí cel·lular α i PP; reprimeix el destí cel·lular β i δ	<i>Arx</i> ^{-/-} : pèrdua de cèl·lula α; expansió de cèl·lules β i δ)

TAULA 2. Visió general d'alguns dels factors de transcripció que governen el desenvolupament i la formació de les cèl·lules β del pàncrees, juntament amb els fenotips dels models genètics de ratolí per aquests factors. MPC, *multipotent progenitor cells* (Adaptat de (Seymour et al., 2011)).

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

Aquests factors de transcripció pertanyen a diferents famílies i poden tenir una funció específica en un moment concret del procés de formació de l'òrgan, o participar en diferents moments de la cascada de diferenciació endocrina i realitzar funcions diverses. Això fa difícil fer una representació precisa i acurada de la cascada transcripcional, però tot i així, existeixen representacions simplificades per al procés de formació dels diferents llinatges cel·lulars en el pàncrees, més estudiat en el cas de les cèl·lules β (veure figura 6).

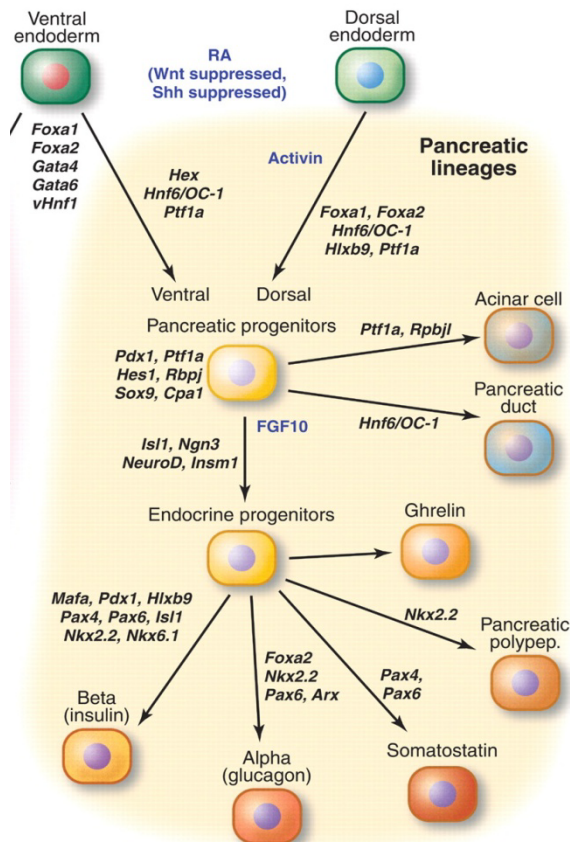


FIGURA 6. Cascada de factors de transcripció que participen en l'organogènesi pancreàtica del ratolí (Zaret et al., 2008).

2.2.1 FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ EXPRESSATS EN ELS PROGENITORS PANCREÀTICS PRIMERENCS

Hi ha una sèrie de factors que inicien el patró d'expressió gènica que portaran a la formació de la regió pre-pancreàtica i posteriorment a l'aparició dels primordis pancreàtics. Dins d'aquest grup de factors tenim gens que pertanyen a la família dels HNF3/forkhead, factors amb homeodominis, com Pdx1, Ptf1a i HB9, o el factor Sox9 de la família dels factors HMG-box.

2.2.1.1. *Pdx1*

El factor Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1) també és conegut com Ip1 (Insulin promoter factor 1) o Idx1 (Islet/duodenum homeobox 1). Pertany a la família de factors transcripcionals amb homeodominis. La expressió de Pdx1 es comença a detectar a partir de l'estadi e9.5 i tots els progenitors pancreàtics que expressen Pdx1 esdevindran cèl·lules pancreàtiques. *Pdx1* és un gen imprescindible, ja que la disrupció d'aquest gen en ratolí dona com a resultat la agènesi pancreàtica (Jonsson et al., 1994). Més tard, un altre estudi va certificar que aquests animals deficients en Pdx1, només desenvolupen un primordi pancreàtic dorsal rudimentari, capaç de formar algunes cèl·lules productores d'insulina i glucagó que no s'expandeixen (Ahlgren et al., 1996). En humans, s'ha descrit en un individu, una mutació en el gen *PDX1/IPF1* que es tradueix en agènesi pancreàtica similar a la observada en ratolí (Stoffers et al., 1997).

L'expressió de Pdx1 varia durant el desenvolupament, mentre que durant les primeres etapes és expressat per totes les cèl·lules epitelials no diferenciades, cap a l'estadi e13 la seva expressió queda restringida a les futures cèl·lules endocrines, principalment les cèl·lules β , sense desaparèixer del tot en les cèl·lules exocrines i ductals.

Més enllà del desenvolupament, Pdx1 és necessari per al correcte funcionament de les cèl·lules β diferenciades. Inicialment, es va identificar com un activador transcripcional del gen de la insulina (Ohlsson et al., 1993) i la somatostatina (Miller et al., 1994), i més tard es va veure que també participava en la expressió gènica d'altres gens específics de l'illot (Waeber et al., 1996; Watada et al., 1996a; Watada et al., 1996b; Macfarlane et al., 2000). De fet, la mutació en el gen de *Pdx1* en humans dona com a resultat l'aparició del tipus de diabetis MODY4 (apartat 1.2.1.3).

2.2.1.2. *Ptf1a*

Ptf1a (pancreas-specific transcription factor 1) també es coneix com p48, i forma part de la família dels factors de transcripció bHLH (basic Helix-Loop-Helix). Aquest factor té un paper molt important en els primers estadis d'especificació pancreàtica, juntament amb *Pdx1* (Burlison et al., 2008).

Ptf1a es comença a expressar immediatament després de *Pdx1* a l'estadi e9.5 en tots els progenitors pancreàtics, però al llarg del desenvolupament el patró d'expressió varia. Mentre que l'expressió continua en les cèl·lules epitelials no diferenciades i en les cèl·lules acinars, la seva expressió disminueix en les cèl·lules endocrines. De fet, en els primers progenitors endocrins, els nivells d'expressió de *Ptf1a* són molt baixos (revisat en (Gittes, 2009)).

De la mateixa manera que passa amb els animals deficients en *Pdx1*, els animals *Ptf1a*^{-/-} desenvolupen un primordi pancreàtic dorsal rudimentari, i en aquest cas, també un de ventral. També s'ha descrit en humans, que l'absència de PTF1A dona com a resultat la no formació de pàncrees (Sellick et al., 2004). Per altra banda, els animals deficients en *Ptf1a* corroboren que aquest gen és determinant per a la diferenciació del llinatge exocrí, tal i com s'explicarà a l'apartat 2.2.2.2, ja que aquests no presenten ni acinis ni ductes, però sí que desenvolupen algunes cèl·lules endocrines que migren cap a la melsa (Krapp et al., 1998).

Mentre que el paper que té *Ptf1a* en el desenvolupament exocrí és clar, en el cas de l'endocrí no ho és tant. De fet, *Ptf1a* interacciona durant el desenvolupament amb un seguit de gens de la via intracel·lular de Notch, que regulen gens acinars específics, en detriment del compartiment endocrí, tal i com està explicat en l'apartat 2.3.

2.2.1.3. *Hlxb9*

Hlxb9 és un factor de transcripció homeodomini que s'expressa en les cèl·lules β adultes. Tot i que trobem expressió d'aquest factor en els dos primordis pancreàtics a e10.5, aquest factor sembla tenir més rellevància al pàncrees dorsal, on precedeix l'expressió de *Pdx1* (revisat a (Gasa, 2005)). Els animals deficients en *Hlxb9* no presenten formació del primordi dorsal, amb un fenotip més sever que no pas els

animals *Pdx1*^{-/-}, mentre que el pàncrees ventral es desenvolupa de manera normal (Harrison et al., 1999; Li et al., 1999).

2.2.1.4. *Sox9*

Sox9 també és un factor de transcripció pancreàtic primerenc i és essencial per a la correcta expansió del pàncrees. *Sox9* es va identificar com un marcador de progenitors pancreàtics pluripotents i la seva expressió colocalitza amb *Pdx1* en estadis primerencs de formació pancreàtica (Seymour et al., 2007). En estadis post-natals, l'expressió de *Sox9* es veu restringida a les cèl·lules ductals.

Els animals deficientes en *Sox9* específics per a pàncrees moren als pocs dies de néixer, i presenten una reducció en la mida del pàncrees que ja és evident a estadi e11.5, afectant tant el pàncrees dorsal com el ventral. Aquest fet que indica que *Sox9* és necessari per a l'expansió de la massa pancreàtica abans del procés de diferenciació (Seymour et al., 2007). Els animals *Sox9*^{-/-} presenten una disminució en l'expressió del factor de transcripció de la via Notch, *Hes1*, el que estaria indicant una possible connexió entre el factor de transcripció *Sox9* i la via de senyalització Notch durant l'organogènesi pancreàtica.

2.2.2 FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ IMPLICATS EN LA DETERMINACIÓ DEL DESTÍ ENDOCRÍ VERSUS EXOCRÍ: LA FAMÍLIA DELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ bHLH

La decisió de destí endocrí o exocrí en el pàncrees és un procés governat per la participació de diferents factors de transcripció de la família dels bHLH (basic hlex-loop-helix). Els bHLH formen part d'una superfamília de reguladors transcripcionals que es troben en gran diversitat d'organismes, des del llevat fins als humans, i participen en múltiples processos de desenvolupament crítics. Tenen un domini bàsic d'unió al DNA seguit d'una estructura hèlix-loop-hèlix que és el que els permet hetero o homodimeritzar amb altres bHLH. Els dímers de bHLH s'uneixen a una seqüència nucleotídica coneguda com a caixa E (CANNTG) en els promotors dels seus gens diana. El domini bHLH va ser identificat per primera vegada en dos factors de transcripció de ratolí, E47 i E12 (Murre et al., 1989), però seguidament es van identificar un seguit de proteïnes que compartien aquest domini, fet que va propiciar-

ne la classificació. Segons aquesta característica, la gran família de factors bHLH està subdividida en quatre classes diferents (classe A, B, C i D). Dins de la classe A trobem proteïnes bHLH d'expressió ubiqua, com les proteïnes E, E47 i E12 que tenen la capacitat tant de dimeritzar amb ells mateixos com de fer-ho amb altres membres de la família, i proteïnes bHLH d'expressió tissular-específica, com per exemple Neurog3, NeuroD, MyoD, myogenin o membres de la família Atonal. Aquests últims, amb algunes excepcions, no poden dimeritzar entre ells, i tenen preferència per fer-ho amb les proteïnes E (Massari et al., 2000; Jones, 2004; Stevens et al., 2008).

En molts sentits, el procés de determinació endocrina del pàncrees imita el procés pel qual es diferencien les neurones en el neuroectoderm en diferenciació. En un mateix escenari on totes les cèl·lules són idèntiques, les primeres que inicien el programa de diferenciació neuronal inhibeixen aquest mateix procés a les cèl·lules veïnes, fent que aquestes romanguin com a cèl·lules precursors, o que adoptin un destí cel·lular diferent. Aquest sistema en concret es basa en l'activació de la cascada de senyalització Notch i el concepte es coneix com a inhibició lateral (Lewis, 1998) (Veure figura 7).

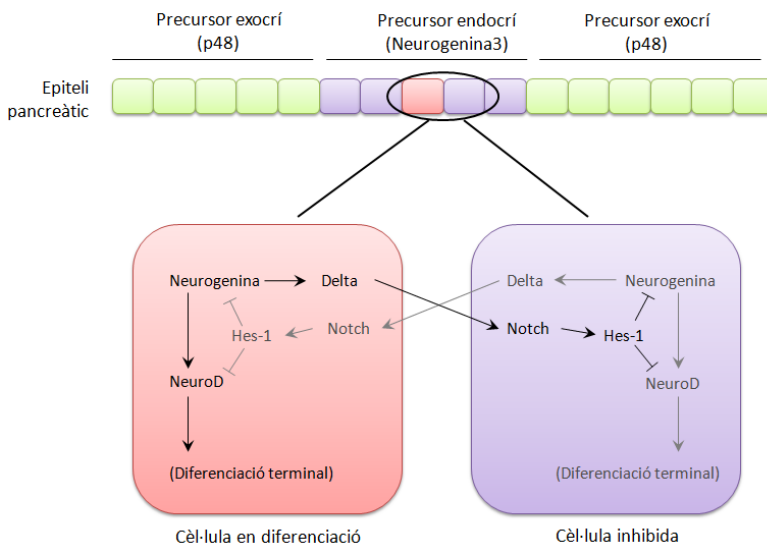


FIGURA 7. Representació del procés d'inhibició lateral que té lloc en el procés de diferenciació, mediat per la cascada de senyalització Notch.

En el pàncrees, és el factor bHLH Hes1, l'efector de la cascada Notch, qui reprimeix l'expressió del factor de transcripció bHLH pro-endocrí Neurog3, restringint així el nombre de cèl·lules endocrines madures (Apelqvist et al., 1999). A les cèl·lules on Neurog3 és reprimida per Hes1, serà necessària l'activació d'uns altres factors bHLH, Ptf1a i Mist1, perquè s'esdevingui correctament l'activació del programa transcripcional exocrí. En els animals deficients per Hes1 s'observa una hipoplàsia severa del pàncrees i una expansió de la massa endocrina deguda a una expressió ectòpica i primerenca de Neurog3 a tot l'epiteli pancreàtic (Jensen et al., 2000). Per altra banda, l'expressió ectòpica de Neurog3 porta a una disminució de la massa endocrina del pàncrees.

2.2.2.1. Neurogenina 3 (Neurog3): gen bHLH pro-endocrí

Neurog3/Atonal homolog5 (Neurog3) és el gen pro-endocrí per excel·lència. Les neurogenines, que es relacionen amb el gen *Atonal* de *Drosophila*, participen en els processos de diferenciació neuronal i els de diferenciació endocrina del tracte gastrointestinal (Gradwohl et al., 2000; Jenny et al., 2002). Neurog3 pertany a la família dels factors de transcripció bHLH (apartat 2.2.2) i actua en els progenitors endocrins com a interruptor gènic iniciant la cascada transcripcional de gens que són necessaris per a (i) l'especificació dels diferents subtipus endocrins, (ii) el procés de diferenciació endocrina i/o (iii) posteriorment per al manteniment del fenotip endocrí madur.

En el pàncrees, Neurog3 és essencial per a la correcta formació de les cèl·lules de l'illot, fet que es corrobora en els animals deficients en Neurog3 els quals no desenvolupen el compartiment endocrí del pàncrees i moren de diabetis pocs dies després del naixement (Gradwohl et al., 2000). Estudis de seguiment de llinatge verifiquen que totes les cèl·lules que són Neurog3⁺ formaran posteriorment les cèl·lules de l'illot, per tant, Neurog3 és un bon marcador de precursors endocrins del pàncrees.

D'altra banda, l'expressió ectòpica de Neurog3 en els progenitors pancreàtics dóna lloc a una diferenciació prematura i exclusiva de cèl·lules endocrines. Aquest fet, posa de manifest la importància d'una regulació molt precisa en l'expressió espai-temporal de Neurog3 per a la correcta formació del compartiment endocrí (Johansson et al., 2007).

- Neurog3: promotor de la diferenciació endocrina

Neurog3 presenta una expressió transitoria al llarg del desenvolupament pancreàtic, quedant exclosa de les cèl·lules endocrines diferenciades. L'expressió de Neurog3 presenta dues onades, una inicial que comença a les poques hores del inici de l'organogènesi pancreàtica a l'estadi e8.5-9, present en un nombre reduït de cèl·lules progenitores. Aquesta primera onada permet la generació de les primeres cèl·lules glucagó positives. L'expressió de Neurog3 disminueix per tornar a augmentar en una segona onada, que és quan apareixen les primeres cèl·lules positives per insulina, adquirint el pic màxim d'expressió a l'estadi e15.5, coincidint amb el màxim d'expansió endocrina del pàncrees. A partir d'aquest moment, l'expressió de Neurog3 comença a disminuir fins a nivells pràcticament indetectables en l'adult (Schwitzgebel et al., 2000) (veure figura 8).

Per tant, durant l'organogènesi pancreàtica es poden observar cèl·lules que expressen Neurog3 a nivells elevats i cèl·lules que l'expressen a nivells més baixos. S'ha demostrat que nivells baixos d'expressió de Neurog3 no permeten una diferenciació endocrina completa i portaran a un canvi de destí cap a llinatge exocrí, reduint la massa cel·lular endocrina (Wang et al., 2010).

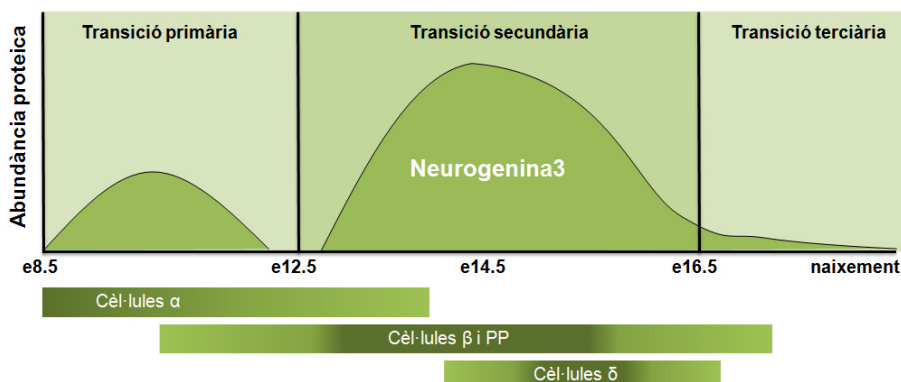


FIGURA 8. Representació de les tres transicions i l'expressió de Neurogenina3 durant el desenvolupament del pàncrees en ratolí. (Adaptat de (Rukstalis et al., 2009))

L'expressió de Neurog3 en pàncrees post-natal ha estat objecte de controvèrsia. Per una banda, els primers estudis van postular que l'expressió de Neurog3 en pàncrees adult era pràcticament indetectable (Gradwohl et al., 2000) (Schwitzgebel et al., 2000), però per altra banda publicacions més recents defensen que Neurog3 es continuaria expressant en l'illot adult, si bé a nivells més baixos que durant el desenvolupament embrionari (Gu et al., 2002; Wang et al., 2009). Wang i els seus col·laboradors defensen que la presència de Neurog3 en l'adult és essencial per a la correcta funció pancreàtica, ja que bloquejant l'expressió de Neurog3 a les cèl·lules β s'observa una disminució en l'expressió de proteïnes essencials per a la funció β cel·lular, com MafA, Pax4, NeuroD1 o la pròpia insulina (Wang et al., 2009).

- Neurog3 i la regeneració pancreàtica

Un aspecte d'interès en el camp de la medicina regenerativa és la possible participació de Neurog3 en el manteniment i la regeneració de la massa cel·lular β en el pàncrees post-natal.

Els estudis realitzats fins al moment arriben a conclusions dispars, possiblement com a conseqüència de diferències intrínseques dels models experimentals de regeneració pancreàtica que s'han utilitzat. Per una banda, hi ha diversos treballs que postulen que, després de la pèrdua massiva de massa cel·lular β com a conseqüència d'una pancreatectomia parcial, les noves cèl·lules β que es formen ho fan per replicació a partir de cèl·lules β pre-existents (Dor et al., 2004; Lee et al., 2006). En aquests casos, no es recapitulària el procés de neogènesi a partir de progenitors que té lloc durant el desenvolupament embrionari. No obstant, cal dir que també hi ha algun estudi en el que es detecta l'expressió de Neurog3 en pàncrees adult (Joglekar et al., 2007) després d'una pancreatectomia parcial.

Xu i els seus col·laboradors (Xu et al., 2008) utilitzen un model animal de regeneració pancreàtica diferent dels anteriors, basat en una lligació parcial del ducte (PDL, pancreatic duct ligation). Amb aquest model observen un augment en el contingut total d'insulina així com de la massa cel·lular β després del dany pancreàtic, que ve acompanyat d'un augment significatiu en els nivells del mRNA de *Neurog3*. Amb aquesta aproximació experimental demostren l'existència de neogènesi dependent de Neurog3.

- Neurog3: promotor de la formació de cèl·lules endocrines

Diversos estudis *in vivo* i *in vitro* demostren que Neurog3 és un gen pro-endocrí capaç de promoure per sí mateix el destí endocrí en contextos cel·lulars adequats. Per exemple, la introducció ectòpica de Neurog3 en cultius primaris de cèl·lules ductals pancreàtiques humanes (Heremans et al., 2002) o en cèl·lules ductals (mPAC) de ratolí (Gasa, Mrejen et al. 2004), inicia la cascada de diferenciació endocrina. Utilitzant aquest model de diferenciació endocrina (veure figura 9), Gasa i els seus col·laboradors demostren com Neurog3 és suficient per a iniciar el programa transcripcional endocrí activant tant factors primerencs de la cascada transcripcional endocrina, així com gens característics de cèl·lules endocrines diferenciades. En aquesta tesi s'ha emprat aquest model per a estudiar el paper de Neurog3 en el procés de diferenciació endocrina del pàncrees.

Però Neurog3 no només és capaç de promoure el destí endocrí *in vitro*, sinó que també és una eina potent per tal de promoure la transdiferenciació de llinatges no-endocrins a endocrins *in situ* en l'organisme. En aquest sentit, s'ha demostrat que Neurog3, combinat amb altres factors de transcripció (MafA i Pdx1), és capaç de dirigir la transdiferenciació de les cèl·lules acinars cap a cèl·lules productores d'insulina (Zhou et al., 2008). Per altra banda, Neurog3 també guia la transdeterminació de les cèl·lules ovals del fetge cap a cèl·lules β (Zhu et al., 2009). Totes aquestes aproximacions indiquen que Neurog3 és un bon candidat per a la formació de noves cèl·lules endocrines en medicina regenerativa.

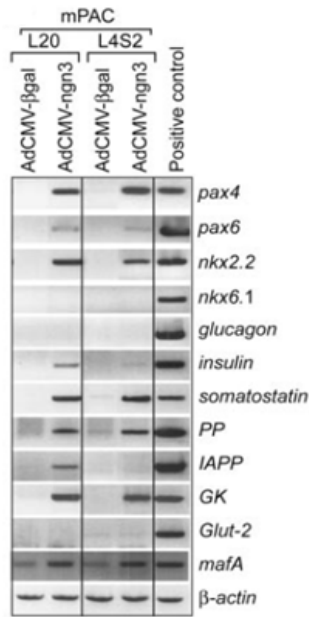


FIGURA 9. Neurog3 inicia el programa transcripcional endocrí en les cèl·lules ductals de ratolí. (Gasa et al., 2004)

2.2.2.2. *Pancreas-specific transcription factor 1 (Ptf1a): gen bHLH pro-exocrí*

L'expressió primerenca de Ptf1a està lligada a l'establiment de progenitors pancreàtics, com ja ha estat exposat amb anterioritat, però més enllà en el temps té un paper lligat a la diferenciació exocrina. Aquestes funcions s'associen a la formació de dos complexos PTF1 diferents que estan formats per tres proteïnes d'unió al DNA: el mateix Ptf1a, una proteïna E ubiqua i l'alternança entre el supressor de Hairless, Rbpjk, en etapes inicials del desenvolupament, i el factor Rbpjl, que és independent de la via Notch, en etapes més tardanes (revisat a(Gasa et al., 2010)).

A l'estadi e12, Ptf1a s'expressa encara en una població de cèl·lules progenitores que donarà lloc a les cèl·lules dels tres llinatges del pàncrees (endocrí, acinar i ductal), que estan marcades alhora per Pdx1, Ptf1a, cMyc i Cpa1. A partir de l'estadi e13.5, no obstant, l'expressió de Ptf1a disminueix en els progenitors endocrins i ductals, i comença a acumular-se al nucli de les cèl·lules acinars, i el complex PTF1 comença a canviar el factor embrionari Rbpjk, pel factor Rbpjl. Aquesta forma final del complex és l'única que s'uneix als promotors dels gens acinars específics de l'adult.

2.2.3 **FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ QUE PARTICIPEN EN LA DIFERENCIACIÓ ENDOCRINA I DETERMINACIÓ DELS DIFERENTS SUBTIPUS CEL·LULARS ENDOCRINS. DIANES GÈNIQUES DE NEUROG3.**

Un cop Neurog3 s'ha expressat en el progenitor pancreàtic, aquella cèl·lula inicia el programa de diferenciació endocrina, però hi ha d'haver altres factors que duguin a terme aquest programa, ja que l'expressió elevada de Neurog3 és transitòria, i que determinin quin tipus cel·lular endocrí, dels quatre existents en l'adult, s'ha de formar. És difícil saber com es determina l'especificació dels diferents llinatges endocrins, ja que no se sap en quin moment es produeix. El que s'ha proposat és que el destí cel·lular concret s'estableix abans que els gens que codifiquen per les hormones pancreàtiques s'activin.

S'han identificat un seguit de factors de transcripció que s'expressen selectivament en el compartiment endocrí durant el desenvolupament del pàncrees i que poden tenir un paper fonamental, tant en la progressió del programa de diferenciació endocrina, com en l'elecció del subtipus cel·lular endocrí concret. La majoria d'ells s'han postulat com a possibles dianes directes de Neurog3. D'una banda, s'han identificat una sèrie de factors, l'eliminació dels quals provoca la pèrdua general de cèl·lules endocrines, pel qual es considera que formarien part d'un programa transcripcional endocrí principal (NeuroD1, Insm1, Isl1). Per altra banda, n'hi ha d'altres la pèrdua dels quals afecta a determinats subtipus endocrins, pel que podrien ser claus en l'elecció del destí endocrí concret. Tots ells contenen homeodominis i es co-expressen amb Neurog3, bé a l'inici o bé al final de la cascada de diferenciació endocrina (Pax4, Arx, Nkx2.2 i Nkx6.1). Finalment, hi ha un altre grup de factors transcripcionals que seran importants pel manteniment del fenotip endocrí madur (Pax6, Isl1, Brn4, Hlx9 i Pdx1). Alguns d'aquests gens seran introduïts en els següents apartats.

2.2.3.1. NeuroD/BETA2

NeuroD1 forma part de la família de factors bHLH proneurals neurogenina/NeuroD. Ha estat descrit com una diana de Neurog3 per diferents observacions; per una banda Neurog3 s'uneix al promotor de NeuroD1 i l'activa, i per l'altra banda, els animals deficients en Neurog3 no expressen NeuroD1, quelcom que no passa en la situació inversa (Huang et al., 2000). De fet, NeuroD1 comparteix amb Neurog3 l'habilitat de funcionar com un gen pro-endocrí quan s'expressa de manera ectòpica en determinats

contextos cel·lulars (Schwitzgebel et al., 2000; Gasa et al., 2004). El model vigent estableix que Neurog3 activa NeuroD1 i aquest s'encarregaria de continuar amb el programa de diferenciació endocrina.

Els animals *NeuroD1*^{-/-} demostren que aquest factor té un paper important en la diferenciació terminal del compartiment endocrí i en la supervivència de les cèl·lules endocrines durant l'embriogènesi. Els animals deficients en NeuroD1 moren durant la primera setmana de vida d'hiperglucèmia severa. L'estudi del fenotip pancreàtic d'aquests animals revela anormalitats en els illots, en els quals s'observa una disminució dràstica de la població de cèl·lules β , i una disminució més lleugera dels altres tipus cel·lulars endocrins (Naya et al., 1997).

Durant el desenvolupament pancreàtic, NeuroD1 s'expressa poc després que s'iniciï l'expressió de Neurog3, però a diferència d'aquesta última, la seva expressió perdura en les cèl·lules de l'illot. De fet, regula l'expressió d'un seguit de gens propis de la cèl·lula β , entre ells, la insulina (Glick et al., 2000).

2.2.3.2. *Math6*

Mouse atonal homolog 6/Atonal homolog 8 (*Math6*) va ser identificat pel nostre grup, i per altres, com a possible diana de Neurog3 utilitzant microarrays d'expressió globals del genoma de cèl·lules ductals pancreàtiques i cèl·lules mare, respectivament (Gasa et al., 2008; Serafimidis et al., 2008).

Math6 pertany a la família de factors de transcripció dels bHLH, igual que les neurogenines, amb els quals manté un 43-57% d'identitat amb altres membres de la família en el domini bHLH. Però a diferència dels factors de transcripció bHLH, que durant el desenvolupament tenen una expressió tissular restringida, *Math6* s'expressa en una gran varietat de teixits en l'embrió. Els animals deficients en *Math6* moren en etapes inicials del desenvolupament (Lynn et al., 2008), el que ens indica que *Math6* té una funció essencial durant el desenvolupament de l'embrió en etapes primerenques. Però *Math6* també participa més endavant en el desenvolupament, en processos de diferenciació. La participació de *Math6* s'ha descrit en diferenciació neuronal en retina (Inoue et al., 2001; Kubo et al., 2010; Yao et al., 2010), en ronyó (Ross et al., 2006), en múscul esquelètic (Yao et al., 2010) i en pàncrees (Lynn et al., 2008). Per tant, *Math6* participa en el procés de diferenciació de diferents òrgans, i de

fet, altres factors bHLH específics de teixit, tenen la capacitat de regular l'expressió de *Math6* *in vitro* (Lynn et al., 2008; Pujadas et al., 2011).

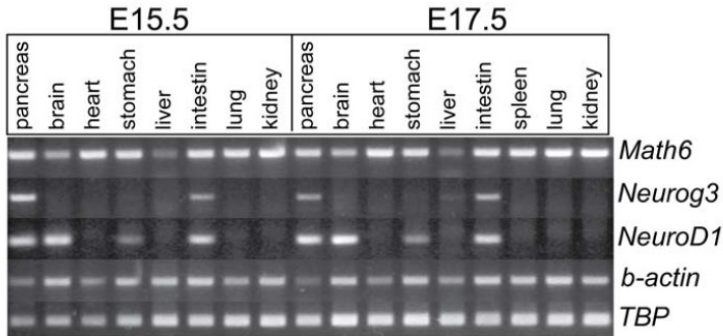


FIGURA 10. Expressió del mRNA de *Math6* en diferents teixits de ratolí en etapa embrionària (Lynn et al., 2008).

L'àmplia expressió que *Math6* exhibeix durant el desenvolupament, disminueix o es veu restringida en unes cèl·lules determinades un cop s'ha acabat el procés de diferenciació del teixit.

Pel que fa al pàncrees, trobem expressió de *Math6* tan en el llinatge endocrí com en l'exocrí durant el període de diferenciació, però la seva expressió disminueix fins a nivells pràcticament indetectables a l'adult. De fet, *Math6* és diana tant de *Neurog3* com de *Ptf1a* (Lynn et al., 2008; Pujadas et al., 2011), el que explicaria la seva presència en els dos compartiments pancreàtics. En base a estudis en models cel·lulars, *Math6* podria tenir un paper regulador de l'activitat pro-endocrina de *Neurog3* contrarestant els efectes inductors de *Neurog3* sobre gens pro-endocrins *in vitro* (Lynn et al., 2008). Però el paper que desenvolupa *Math6* durant el procés de diferenciació endocrina del pàncrees *in vivo* no es coneix i és objecte d'estudi en el nostre grup.

2.2.3.3. *Pax4* i *Arx*

Pax4 s'expressa tan en sistema nerviós central com en pàncrees. Els models animals específics per aquest factor, demostren que és essencial pel correcte desenvolupament del compartiment endocrí pancreàtic. Els animals deficients en *Pax4*

no generen cèl·lules β ni cèl·lules δ , i les cèl·lules α són més abundants, però estan mal organitzades. Això es tradueix en un fenotip diabètic que els causa la mort als pocs dies de néixer (Sosa-Pineda et al., 1997).

L'expressió de Pax4 va lligada a l'expressió de Neurog3, ja que també s'expressa de manera transitòria i presenta un pic d'expressió a e15, per després disminuir fins a nivells pràcticament indetectables en l'adult (Smith et al., 1999). El promotor de Pax4 presenta llocs d'unió per a Neurog3, indicant-lo com a possible diana directa de Neurog3 (Smith et al., 2000; Smith et al., 2003). A més, els animals *Neurog3*^{-/-} no expressen Pax4 (Gradwohl et al., 2000).

S'ha proposat que Pax4 pugui tenir la funció de suprimir la diferenciació dels progenitors Neurog3⁺ cap a llinatge α , reprimint gens propis de la diferenciació α , com per exemple Arx, i de fet, Pax4 inhibeix directament l'expressió de Arx (Collombat et al., 2003). El fet que els animals Pax4^{-/-} presentin aquesta expansió de les cèl·lules α , en detriment de les poblacions cel·lulars β i δ , reflecteix que Pax4 actuarà com un repressor transcripcional competint amb Arx. Arx està per sota de Neurog3 en la cascada transcripcional endocrina, ja que els animals *Neurog3*^{-/-} no presenten expressió d'aquest factor. Arx clarament participa en la diferenciació del llinatge α , ja que els animals deficients per aquest factor no presenten aquest tipus cel·lular (Collombat et al., 2003). Contràriament, la sobreexpressió de Arx en progenitors pancreàtics Pdx1⁺ resulta en la transformació de moltes cèl·lules precursors β i δ cap als llinatges α i PP (Collombat et al., 2007), donant suport a la idea d'aquests efectes contraposats entre Pax4 i Arx en la determinació dels llinatges endocrins (veure figura 11).

Pax6 comença a expressar-se en els progenitors pancreàtics en paral·lel amb l'inici d'expressió de les hormones. A diferència de Pax4, l'expressió de Pax6 perdura en totes les cèl·lules de l'illot durant el desenvolupament i també en l'etapa adulta. La inactivació condicional de Pax6 en el pàncrees endocrí dona com a resultat la mort prematura per diabetis d'aquests animals, indicant que aquest factor té un paper essencial en mantenir la funció de les cèl·lules β adultes (Ashery-Padan et al., 2004).

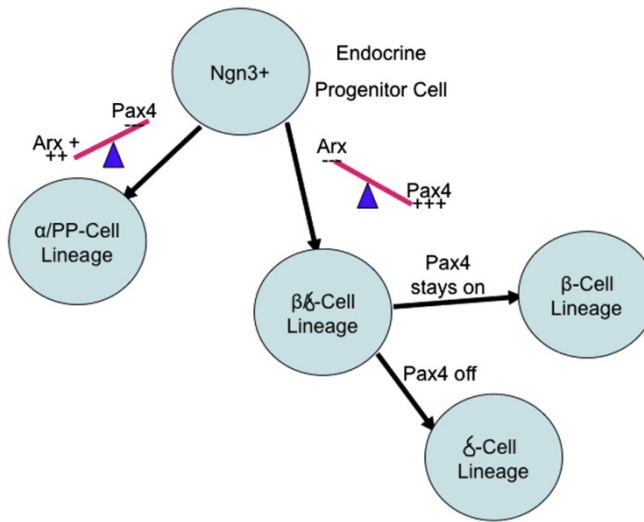


FIGURA 11. Els factors de transcripció Pax4 i Arx competeixen per a la determinació del destí cel·lular entre els llinatges α/PP o β/δ (Gittes, 2009).

2.2.3.4. Factors de transcripció NK: Nkx2.2 i Nkx6 (Nkx6.1 i Nkx6.2)

Els factors homeobox NK, Nkx2.2 i Nkx6, són essencials per dirigir els progenitors endocrins cap al llinatge β.

Nkx2.2 comença a expressar-se en l'epiteli pancreàtic una mica més tard que Pdx1 fins a l'estadi e13, on la seva expressió queda restringida a les cèl·lules Neurog3⁺. Trobem expressió de Nkx2.2 a les cèl·lules α, β i PP diferenciades. El promotor de Nkx2.2 conté caixes E, suggerint que podria ser regulat per factors pro-endocrins de la família bHLH. De fet, la sobreexpressió de Neurog3 i NeuroD1 en cèl·lules ductals de ratolí indueix l'expressió de Nkx2.2 (Gasa et al., 2004).

Els animals deficientes en Nkx2.2 moren de diabetis després del naixement. Aquests no desenvolupen cèl·lules β, i presenten un nombre reduït de cèl·lules α i PP (Sussel et al., 1998), i com a resposta s'observa un increment en la població de cèl·lules ε, positives per grelina, que conformaran l'illot d'aquests animals (Prado et al., 2004). A més, els illots d'aquests animals tenen una població de cèl·lules que expressen alguns marcadors de cèl·lula β, com Pdx1 i IAPP, però no pas tots. Això fa pensar que en aquests animals es dona l'especificació de la cèl·lula β però aquestes cèl·lules no completen la seva diferenciació.

Els factors Nkx6 (Nkx6.1 i Nkx6.2) tenen patrons d'expressió que difereixen durant en desenvolupament (Henseleit et al., 2005). La co-expressió dels dos, només es detecta en les primeres etapes d'especificació pancreàtica, quan tenim expressió de Pdx1 en els progenitors pancreàtics, a l'estadi e10.5. Després l'expressió de Nkx6.2 disminueix i en l'estadi e15.5 només es detecta en un petit nombre de cèl·lules que expressen glucagó i en cèl·lules exocrines. Per contra, Nkx6.1 té un patró d'expressió semblant a Nkx2.2, amb la diferència que, en l'adult, només el trobem a les cèl·lules β . Mentre que els animals *Nkx6.2^{-/-}* no presenten cap fenotip pancreàtic, els animals *Nkx6.1^{-/-}* presenten una reducció dràstica en el nombre de cèl·lules β . De fet, aquesta reducció de l'expansió de la població cel·lular β es detecta per primera vegada durant la transició secundària, perquè abans d'aquesta, els animals control i els mutants no presenten diferències, però en el naixement, la reducció en el nombre de cèl·lules β arriba al 95% (Sander et al., 2000). Els animals doble mutants *Nkx6.1/Nkx6.2* presenten una reducció severa en el nombre de cèl·lules α , el que demostra una funció redundant dels factors Nkx6, indicant que Nkx6.1 pot tenir una funció més general que no únicament exclusiva del llinatge β (Henseleit et al., 2005).

Per altra banda, els illots dels animals *Nkx6.1^{-/-}* no presenten alteracions en l'expressió de Nkx2.2, cosa que sí passa a la inversa, portant a concloure que Nkx6.1 està per sota de Nkx2.2 en la cascada transcripcional endocrina. Els animals doble mutants per Nkx2.2 i Nkx6.1 presenten un fenotip molt similar als animals *Nkx2.2^{-/-}* simples (Sander et al., 2000).

Tot i que s'ha proposat que els factors Nkx, de la mateixa manera que NeuroD1 o Pax4, actuen per sota de l'acció de Neurog3, ja que els mutants per aquests factors presenten alteracions en llinatges concrets, estudis recents proposen que, el correcte desenvolupament del llinatge cel·lular β necessita de l'activació de Nkx6 en els progenitors Pdx1⁺ abans que aparegui Neurog3 (Nelson et al., 2007). Per altra banda, els factors transcripcionals Nkx6 semblen jugar un paper important en l'elecció del destí cel·lular endocrí, ja que s'ha proposat que la interacció de repressió entre els factors Nkx6 i Ptf1a governa la decisió entre llinatge pancreàtic endocrí i exocrí, respectivament (Schaffer et al., 2010).

2.3 VIES DE SENYALITZACIÓ IMPLICADES EN EL DESENVOLUPAMENT DEL PÀNCREES

Juntament amb l'establiment de les xarxes transcripcionals descrites en els apartats anteriors, l'activació i/o repressió de certes vies de senyalització intracel·lulars són necessàries per al correcte desenvolupament del pàncrees, tant en etapes primerenques de formació de l'òrgan, com també més tard en el procés de diferenciació dels diferents tipus cel·lulars. Entre aquestes vies trobem la via de senyalització Hedgehog (Hh), la via del factor de creixement fibroblàstic (Fibroblast Growth Factor, Fgf), la via Notch, la via Wingless (Wnt) i la via del factor de creixement transformant beta (Transforming Growth Factor beta, TGF- β) (revisat a (Guo and Hebrok, 2009) i (Oliver-Krasinski et al., 2008)). Tot i que s'està avançant molt en el camp, encara se sap molt poc sobre com les diferents vies de senyalització interactuen entre elles mateixes o amb les cascades transcripcionals durant el desenvolupament pancreàtic.

A part dels senyals intrínsecs, ja fa temps que es va postular que els senyals procedents del mesènquima són també essencials per al creixement i la diferenciació de l'epiteli pancreàtic, establint així una interacció epiteli-mesenquimal (Golosow et al., 1962), (revisat a (Seymour and Sander, 2011)). Recentment, amb l'ajuda dels models animals, s'han començat a caracteritzar aquests senyals provinents del mesènquima que agrupen tant factors de transcripció, com molècules de senyalització, com per exemple el treball recent del grup de Hebrok (Landsman et al., 2011).

Els canvis en l'expressió temporal i espacial de la via de senyalització Hh regulen diferents aspectes de la formació del pàncrees inicial i del compartiment endocrí en concret. Se sap que l'expressió de la via Hh en etapes inicials del desenvolupament pancreàtic, inhibeix la formació de l'òrgan i l'expressió primerenca de Pdx1 (Kim et al., 1998; Hebrok et al., 2000). Per altra banda, la via de senyalització Hh podria estar regulant la grandària del pàncrees i de la massa endocrina. Hi ha estudis que suggereixen que, la via Hh podria estar regulant el nombre de progenitors pancreàtics a través de la supervivència, proliferació i estat de diferenciació d'aquestes cèl·lules (revisat a (Oliver-Krasinski and Stoffers, 2008)).

La via de senyalització Fgf també participa en la formació del pàncrees. A part de la participació de Fgf2 iniciant l'expressió de Pdx1 en el primordi pancreàtic, s'han descrit altres membres de la família que regulen l'expansió i diferenciació de l'epiteli pancreàtic. S'han identificat diferents lligands i receptors en etapes primerenques del desenvolupament pancreàtic. El més ben caracteritzat és el lligand Fgf10. Se sap que regula el creixement i la morfogènesi del primordi pancreàtic promovent la proliferació de les cèl·lules progenitores epitelials Pdx1⁺. A més, el lligand Fgf10 s'encarrega de mantenir l'expressió de la via Notch i del factor de transcripció Hes1, prevenint així la diferenciació primerenca dels progenitors (revisat a (Oliver-Krasinski and Stoffers, 2008)).

La participació de la via de senyalització Notch en l'organogènesi pancreàtica es coneix des de fa temps. Diferents lligands i receptors de la via s'expressen en pàncrees embrionari de ratolí, així com també el component de la via Hes1, exposat amb anterioritat, que reprimeix l'expressió de Neurog3. Animals deficients en diferents components de la via, com RBP-Jk, Dll1 o Hes1, presenten un increment en el nombre de cèl·lules Neurog3⁺, una diferenciació endocrina prematura i pàncrees hipoplàsic (Apelqvist et al., 1999; Jensen et al., 2000; Fujikura et al., 2006). Pel contrari, la sobreexpressió del lligand Notch1 sota el control de Pdx1 dóna com a resultat una reducció en el nombre de cèl·lules Neurog3⁺ i de cèl·lules endocrines (Murtaugh et al., 2003). Els membres de la família Hes (Hes1, Hey1 and Hey2) s'uneixen directament a Ptf1a per inhibir la seva funció. Tots aquests estudis indiquen que la via Notch, en els primers estadis de formació pancreàtica, és responsable del manteniment de l'estat indiferenciat dels progenitors pancreàtics, permetent la correcta formació de l'òrgan, i suprimint la diferenciació exocrina i endocrina a través de la inhibició de l'expressió de Ptf1a i Neurog3, respectivament.

S'ha descrit la presència de diferents components de la via de senyalització Wnt en pàncrees embrionari, tant en el mesènquima com en l'epiteli. S'han identificat diferents lligands Wnt, receptors Fzd, co-receptors LRP i inhibidors Fsrp (Heller et al., 2002). S'han creat diferents models animals per a estudiar la funció d'aquesta via en el procés de desenvolupament pancreàtic. Aquests han portat a definir que aquesta via regula de manera general el creixement del pàncrees, intervenint tant en etapes inicials de formació de l'òrgan com en la diferenciació i proliferació acinars (revisat a

(Oliver-Krasinski and Stoffers, 2008)). Dels resultats obtinguts en els estudis del compartiment endocrí, en canvi, és difícil treure'n cap conclusió clara: l'estudi de models genètics, en els quals s'ha suprimit algun dels components de la via, donen resultats contraposats pel que fa a la participació d'aquesta via en la formació del compartiment endocrí en els diferents estudis publicats fins ara. El paper d'aquesta via en el desenvolupament pancreàtic serà abordat amb més profunditat en el següent apartat de la Introducció.

La senyalització TGF- β també s'ha identificat tant en mesènquima com en epitelí pancreàtic, així com també en illots adults i en desenvolupament. Diferents estudis en models animals assenyalen la importància d'aquesta via en el desenvolupament endocrí. Però la manera com aquesta via influeix en la formació, la supervivència o l'expansió dels progenitors endocrins i de les cèl·lules endocrines diferenciades no s'ha establert. Un exemple de la participació d'aquesta via en la morfogènesi pancreàtica és el lligand Gdf11, que regula el desenvolupament dels compartiments endocrí i exocrí pancreàtics. Els animals *Gdf11*^{-/-} presenten un increment en el nombre de progenitors endocrins Neurog3⁺, suggerint un paper inhibitor de Gdf11 sobre aquest compartiment (Harmon et al., 2004). Aquests animals, alhora presenten un augment del compartiment exocrí, atribuint un possible paper d'aquest lligand en el procés de decisió del destí cel·lular entre ambdós compartiments pancreàtics.

La participació de totes aquestes vies està exemplificada en la següent figura:

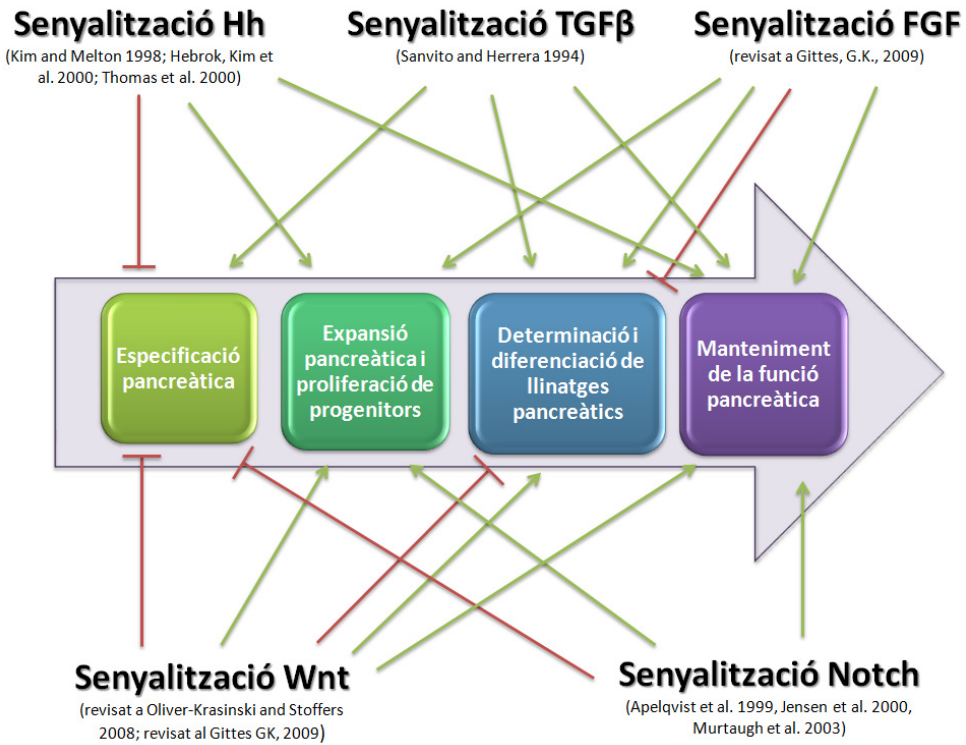


FIGURA 12. Representació esquemàtica del conjunt de vies de senyalització principals que intervenen en l'organogènesi pancreàtica en les diferents etapes de formació de l'òrgan.

3. LA VIA DE SENYALITZACIÓ WINGLESS (WNT)

3.1 INTRODUCCIÓ GENERAL I COMPONENTS PRINCIPALS

La via de senyalització wingless (Wnt) va ser identificada per primera vegada en la mosca de la fruita (*Drosophila melanogaster*) (Sharma et al., 1976). La via de Wnt és una de les vies de senyalització més intensament estudiades degut a la seva importància durant el desenvolupament. Per exemple, la seva participació durant la formació de l'eix dorso-ventral (Tao et al., 2005) o en la carcinogènesi, de càncers com el de mama o colorectal (Bienz et al., 2000).

Aquesta via juga un paper important tant en l'etapa embrionària com en l'adult, on regula processos cel·lulars claus com la proliferació, la diferenciació, la migració cel·lular així com en càncer. La importància d'aquesta via queda reflectida en la seva conservació al llarg de l'evolució en diferents espècies.

La participació de la via Wnt en processos carcinogènics ha estat àmpliament estudiada. Se sap que la desregulació de la via Wnt, sobretot de la via canònica (veure apartat 3.1.1.), dona com a resultat el desenvolupament de càncer, majoritàriament per tres processos: bloqueig del complex de destrucció, mutacions constitutives de la β -catenina o mutacions de pèrdua de funció d'inhibidors de la via. La via Wnt va ser relacionada amb càncer per primera vegada quan es va identificar la seva activació constitutiva en la forma heretable dels pòlips adenomatosos familiars (FAP, familiar adenomatous polyposis) i en formes espontànies de càncer de colon, sent aquest últim el tipus de càncer més freqüent en humans (revisat a (Barker et al., 2006). Òbviament, la via de senyalització Wnt també s'ha relacionat amb l'adenocarcinoma pancreàtic on β -catenina sembla tenir un paper important (Heiser et al., 2008).

De manera resumida, la cascada de senyalització Wnt s'inicia quan hi ha unió entre el receptor específic de membrana i la molècula secretada de la família Wnt. Aquesta unió desencadena una cascada intracel·lular que acaba en el nucli on s'exerciran canvis a nivell d'expressió gènica.

Existeixen com a mínim tres vies de senyalització Wnt diferents: la via canònica Wnt/ β -catenina, la via de senyalització del calci Wnt/ Ca^{2+} i la via de moviment i polaritat cel·lular Wnt/PCP (planar cell polarity) (figura 13).

3.1.1 VIA CANÒNICA WNT/ β -CATENINA

Es tracta de la via Wnt més extensament estudiada. Aquesta via s'activa quan un lligand Wnt s'uneix al seu receptor de membrana Fzd (Frizzled) i al co-receptor Lrp5/6 (Lipoprotein receptor-related protein 5/6). Els lligands Wnt també poden interaccionar amb diferents antagonistes, com per exemple els membres de la família Sfrp (secreted frizzled-related protein) que són formes secretades dels receptors Frizzled, que comparteixen amb aquests els dominis rics en cisteïnes (CRD, cysteine rich domains) però no tenen els dominis transmembrana (Kawano et al., 2003; Mii et al., 2011). Els Sfrp s'uneixen de manera específica amb els lligands Wnt impeding la seva unió als receptors de membrana Fzd. Un altre antagonista de la via Wnt són els membres de la família Dkk (Dickkopf) que són proteïnes secretades que interaccionen amb els co-receptors Lrp bloquejant la cascada de senyalització (Niehrs, 2006; Chien et al., 2009). El component clau que defineix aquesta és la β -catenina.

3.1.1.1. *β -catenina*

La proteïna β -catenina va ser descoberta inicialment pel seu paper en l'adhesió cel·lular (Kemler, 1993), i no va ser fins més tard que, gràcies a la seva homologia amb armadillo, el seu homòleg a *Drosophila*, es va ubicar com a gen clau de la via de senyalització Wnt (Gumbiner, 1995).

La β -catenina es troba majoritàriament unida a membrana, ja que en la seva forma citoplasmàtica és altament inestable i fàcilment degradable en absència de la senyalització Wnt. L'estructura proteica consta d'un extrem amino-terminal que conté els llocs de fosforilació i un extrem carboxi-terminal que conté el domini d'activació transcripcional. La regió central conté repeticions armadillo que són necessàries per a la interacció amb E-cadherina, Axina, Apc i els factors Tcf/Lef.

En el mode inactiu de la via de senyalització Wnt, la β -catenina citoplasmàtica que no està unida a cadherines és fosforilada pel complex de destrucció, després ubiquitinitzada i finalment dirigida a proteasoma per a ser degradada. El complex de destrucció està format per dues proteïnes d'ensamblatge (scaffolding proteins), axina i

Apc (Adenomatous Polyposis Coli), i per dues quinases, Gsk3 β (glycogen syntase kinase 3 β) i CK1 α (casein kinase 1 α). Per contra, quan hi ha activació de la via, hi ha fosforilació de la proteïna dishevelled (Dsh), fet que disgrega al complex de destrucció. Això permet una acumulació de β -catenina citoplasmàtica, i aquesta entra a nucli on interacciona amb els factors de transcripció de la família Tcf/Lef (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) i exerceix les seves funcions com a regulador transcripcional.

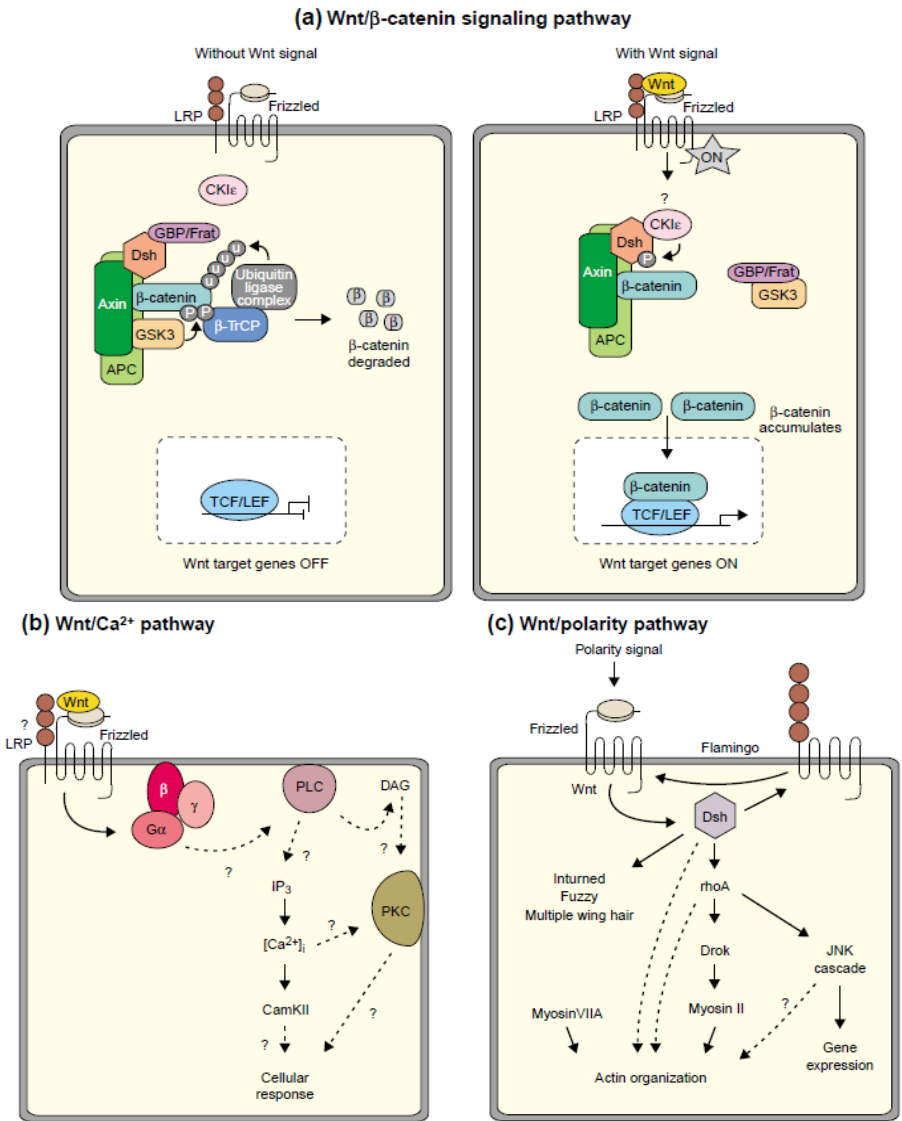


FIGURA 13. Esquema de les diferents vies de senyalització Wnt descrites: Wnt/ β -catenina, Wnt/ Ca^{2+} i Wnt/PCP (Miller, 2002).

3.1.1.2. Factors Tcf/Lef

La família dels factors Tcf (T-cell factors) i Lef (lymphoid enhancer factor) formen part de la superfamília dels factors de transcripció amb una caixa HMG (high motility group) (Hurlstone et al., 2002; van Noort et al., 2002). De la mateixa manera que passa amb altres membres de la via, els factors Tcf són altament conservats al llarg de l'evolució, ja que tenen un paper important durant l'embriogènesi.

S'han identificat quatre homòlegs diferents de la família: Lef1, Tcf1 (Tcf7), Tcf3 (Tcf7l1) i Tcf4 (Tcf7l2), essent els últims tres expressats en pàncrees de ratolí (Columbus et al., 2010). Tots ells reconeixen la mateixa seqüència de DNA però presenten un patró d'expressió teixit-específic.

Una de les característiques dels factors Tcf/Lef és que presenten *splicing* alternatiu donant com a resultat una varietat d'isoformes diferents (Van de Wetering et al., 1996). Una altra característica és que no poden actuar com a activadors transcripcionals per ells mateixos, ja que els manca el domini d'activació, per això forma el complex transcripcional activador amb β -catenina.

En absència de senyalització Wnt, els factors Tcf/Lef romanen units a repressors transcripcionals, tals com Groucho i CtBP, inhibint l'expressió dels gens diana de la via Wnt. Per contra, amb l'activació de senyalització Wnt i amb l'entrada de β -catenina a nucli, aquesta forma un complex transcripcional amb els factors Tcf/Lef que desplaça els co-repressors activant així la transcripció dels gens diana de la via Wnt. S'han identificat diferents dianes gèniques del complex β -catenina-Tcf/Lef, com per exemple *c-Myc* (He et al., 1998), *c-Jun* (Mann et al., 1999) o *cyclinD1* (Shtutman et al., 1999; Tetsu et al., 1999) relacionades amb proliferació, o *MMP-7* (matrix metalloproteinase-7) (Brabletz et al., 1999) relacionada amb la invasió tumoral i la degradació de la matriu extracel·lular. Es pot trobar una extensa llista de les dianes de la via Wnt i tota la informació actualitzada de la via en la pàgina web del laboratori del Dr. Nusse (www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/).

De tots ells, Tcf7l2 pren especial rellevància en el pàncrees, com ja s'ha exposat en l'apartat 1.2.1.2, per la seva associació amb el risc de patir diabetis tipus 2, així com també per la seva implicació en la funcionalitat de la cèl·lula β .

3.1.2 VIES NO CANÒNIQUES

L'existència de vies de senyalització iniciades per lligands Wnt i que actuen de manera independent de l'acció de β -catenina han portat a la definició de les vies no canòniques de Wnt: Wnt/ Ca^{2+} i Wnt/PCP.

La intervenció de diferents proteïnes en ambdues cascades suggereix la possibilitat de que es tracti d'una única via de senyalització enlloc de dues vies independents (revisat a (Chien et al., 2009)), però aquesta hipòtesi queda pendent de ser confirmada experimentalment, així com també la premissa que les vies independents de β -catenina són reguladores de la via canònica de Wnt.

3.1.2.1. *Via Wnt/ Ca^{2+}*

Uns anys enrere es va observar que l'acció de certs lligands Wnt tenien efectes sobre la secreció intracel·lular de calci (revisat a (Kestler et al., 2008)). En concret, la injecció de RNA codificants per certs lligands Wnt o receptors Fzd en embrions de peix zebra promouen la secreció de calci, mentre que la pèrdua de funció de Wnt11 o Wnt5a donava com a resultat una disminució de la senyalització intracel·lular de calci.

La senyalització intracel·lular de calci promoguda per la senyalització Wnt indueix l'activació de diferents enzims intracel·lulars específics sensibles a l'acció del calci, com PKC (protein kinase C), CamKII (calcium-calmodulin-dependent kinase II) o la calcineurina fosfatasa sensible al calci que porta a l'activació del factor de transcripció NF-AT.

Aquesta via de senyalització està implicada en l'organització dorso-ventral dels embrions de *Xenopus* i de peix zebra, en la regulació de la via Wnt/ β -catenina, en la formació de tumors i en la regulació de les transicions epiteli-mesenchimals (Kestler and Kuhl, 2008).

3.1.2.2. *Via Wnt/PCP o Wnt/JNK*

Aquesta via de senyalització va ser identificada en *Drosophila* com a responsable de regular la polaritat cel·lular de les cèl·lules epitelials, per això rep el nom de PCP (planar cell polarity), però també es coneix com a Wnt/JNK, per la participació en aquesta via de senyalització de la quinasa Jun.

L'acció principal d'aquesta via intracel·lular és l'activació de les GTPases rho (rhoA, rac o cdc42), que acabaran activant membres de la via com Jnk o ROK (quinasa rho). Aquesta cascada de senyalització també implica la participació de l'intermediari Dsh (dishevelled) que s'uneix a proteïnes transmembrana com Stbm (strabismus), Dgo (diego) o Pk (prickle). Aquesta via de senyalització està implicada en processos de polaritat cel·lular o moviments cel·lulars (revisat a (Kestler and Kuhl, 2008)).

3.2 VIA DE SENYALITZACIÓ WNT: DESENVOLUPAMENT PANCREÀTIC

La via Wnt és important en la formació de molts òrgans per la seva participació en la regulació de les interaccions epiteli-mesenquimals (Nusse et al., 1992). El pàncrees no n'és una excepció. La via de senyalització Wnt/ β -catenina és essencial per al correcte desenvolupament del pàncrees. S'ha descrit la presència de diferents components de la via en pàncrees embrionari de ratolí des de l'estadi e12.5 fins a l'etapa post-natal (Heller et al., 2002), així com també en pàncrees humà adult (Heller et al., 2003).

3.2.1 EXPRESSIÓ DE COMPONENTS DE LA VIA WNT EN PÀNCREES EMBRIONARI

En pàncrees embrionari de ratolí, β -catenina té una expressió transitòria. Es pot localitzar β -catenina en la seva forma citoplasmàtica (fosforilada) en totes les cèl·lules de l'epiteli pancreàtic entre els estadis e11.5-13.5 per després començar a disminuir fins a ser indetectable en el naixement (revisat a (Bonal et al., 2008)). Els lligands de Wnt generalment estan localitzats en el mesènquima pancreàtic, en les etapes més inicials del desenvolupament pancreàtic, però també podem trobar-ne l'expressió en epiteli, com és el cas del lligand Wnt5a. Més endavant, cap als estadis e15.5-17.5, es detecta l'expressió d'alguns lligands a prop de cèl·lules endocrines com és el cas de Wnt1 i Wnt5a, o fins i tot colocalitzant amb cèl·lules que expressen insulina (Wnt5b, Wnt11) i glucagó (Wnt5b) (Heller et al., 2002).

Per altra banda, els receptors Fzd i els inhibidors sFrp es localitzen tant en mesènquima com en epiteli en etapes primerenques de desenvolupament pancreàtic, com és el cas de Fzd2 i 7, i alguns d'ells estan localitzats específicament en cèl·lules

endocrines més endavant en el desenvolupament, com és el cas de Fzd2, 3 i 7 o sFrp2 i 3 (Heller et al., 2002).

3.2.2 **LA IMPORTÀNCIA DE β -CATENINA EN L'ORGANOGENESI PANCREÀTICA**

Hi ha molts indicis que demostren que la via Wnt participa en el procés d'organogènesi pancreàtica, com per exemple l'expressió de components de la via exposats en l'apartat anterior. Però la manera en com ho fa és força confusa. La utilització de diferents models transgènics aporta encara més confusió a la participació d'aquesta via, possiblement degut a les diferents estratègies utilitzades i a la importància del context espai-temporal en el que actua.

Els models animals més àmpliament utilitzats, i que exposem seguidament, es basen en l'alteració de l'expressió de β -catenina. Aquesta, tot i ser el component clau de la via de senyalització, no hem d'oblidar que participa en processos d'adhesió cel·lular, el que aporta més confusió a tot plegat, ja que es fa difícil establir si els resultats que s'observen són deguts a la participació de β -catenina dins de la via Wnt o si també hi intervenen fenòmens d'estructura cel·lular.

Els animals deficients en β -catenina moren en estadis inicials de desenvolupament, durant la gastrulació (Haegel et al., 1995), fet que dificulta l'estudi de la seva participació en la formació del pàncrees i que ha fet necessària la creació de models transgènics condicionals, per a poder definir la funció espai-temporal d'aquesta via durant el desenvolupament pancreàtic.

Quatre estudis independents han utilitzat diferents formes del promotor de *Pdx1* per regular de manera condicional la via de senyalització Wnt/ β -catenina en pàncrees, i estudiar quin és el seu paper en l'organogènesi pancreàtica:

- Murtaugh i els seus col·laboradors utilitzen el model Catnb^{lox/lox}; Pdx1-Cre, amb el que delecionen de manera condicional β -catenina en els progenitors pancreàtics Pdx1⁺. Aquests observen com a resultat una lleugera disminució en la proliferació d'aquests progenitors i l'absència de teixit acinar, sense afectació de la massa cel·lular endocrina o de la seva funció. Aquests animals, presenten un pàncrees hipoplàsic tot i que no s'observa una diferenciació prematura de progenitors pancreàtics o un augment de l'apoptosi (Murtaugh et al., 2005).

- Utilitzant una estratègia semblant però amb una línia transgènica Cre diferent, Catnb^{lox/lox}, Pdx1-Cre, Wells i els seus col·laboradors (Wells et al., 2007) obtenen resultats equivalents als observats per Murtaugh. Observen que els animals deficientes en β -catenina presenten una mida corporal reduïda i una esperança de vida més curta. Pel que fa al fenotip pancreàtic, aquests animals tenen una hipoplàsia severa del pàncrees, que es comença a detectar a l'estadi e16.5, i que es tradueix en una reducció del 70% de la massa pancreàtica respecte als animals salvatges adults. Aquesta reducció pancreàtica afecta de manera exclusiva el teixit acinar, que és completament absent en aquests animals. Respecte al compartiment endocrí, no es detecten canvis significatius respecte als animals controls pel que fa al nombre i a la morfologia dels illots.

Igual que Murtaugh, Wells demostra que aquesta disminució del compartiment exocrí es deu a una disminució significativa de la taxa proliferativa però no existeix un augment en l'apoptosi.

- Heiser i col·laboradors han estudiat l'efecte de l'expressió de la forma estabilitzada de β -catenina a l'epiteli pancreàtic en diferents estadis de desenvolupament, demostrant la implicació de la senyalització Wnt/ β -catenina en l'organogènesi pancreàtica. Utilitzant dues línies transgèniques que expressen la recombinasa Cre sota el control del promotor de *Pdx1*, i creuant-los amb la línia transgènica que expressa β -catenina de manera constitutiva ($Pdx1Cre^{early}/\beta-cat^{active}$ o $Pdx1Cre^{late}/\beta-cat^{active}$), els ha permès estudiar els efectes de l'expressió de β -catenina en dominis espai-temporals diferents (Heiser et al., 2006).

Utilitzant una línia transgènica de ratolí que expressa la recombinasa Cre de manera primerenca ($Pdx1Cre^{early}$) i una altra que ho fa de manera tardana ($Pdx1Cre^{late}$) i creuant-les amb una línia transgènica que expressa β -catenina de manera constitutiva ($\beta-cat^{active}$) els ha permès observar diferents fenotips (veure figura 14). La línia transgènica $\beta-cat^{active}$ es basa en que l'exó 3 del gen de la β -catenina codifica pels llocs de fosforilació de la proteïna que permet la inactivació de la β -catenina. D'aquesta manera, eliminant l'exó 3 aconseguixen l'expressió d'una proteïna anòmala que està activa de manera constitutiva.

Per una banda, creuant les dues línies transgèniques $Pdx1Cre^{early}$ i $\beta-cat^{active}$ observen una pèrdua quasi total de teixit pancreàtic, que afecta per igual el compartiment endocrí i l'exocrí.

Per altra banda, l'ús de la línia transgènica de ratolí que expressa la recombinasa Cre de manera tardana ($Pdx1Cre^{late}$) creuada amb la línia transgènica $\beta-cat^{active}$ dona com a resultat un pàncrees aparentment normal pel que fa a morfologia i arquitectura, però que presenta un increment de massa respecte dels pàncrees dels animals control. Per tant, aquests resultats corroboren que és durant els primers estadis de formació pancreàtica quan la regulació de la via Wnt/ β -catenina és essencial per a la correcta formació de l'òrgan. Aquesta ha d'estar reprimida per a que es formi el pàncrees, de la mateixa manera que també demostren dos treballs independents utilitzant models animals diferents, un en peix zebra (zebrafish) (Nadauld et al., 2004) i l'altre en *Xenopus* (McLin et al., 2007), on l'expressió ectòpica de β -catenina dona com a resultat la total absència de pàncrees i fetge.

- Finalment, Dessimoz i els seus col·laboradors, utilitzant línies transgèniques reporteres, defensen que la via de senyalització Wnt/ β -catenina està activa de manera específica en el compartiment endocrí embrionari (Dessimoz et al., 2005), al contrari del que s'exposa en els estudis anteriors. Utilitzant un model transgènic condicional per β -catenina sota el control del promotor de *Pdx1* ($Pdx1-Cre;R26R; \beta-cat^{flox/lacZ}$) observen que les cèl·lules deficientes en β -catenina són hipoproliferatives i aquesta reducció en la taxa de proliferació afecta específicament el compartiment endocrí a l'estadi e14.5, on s'observa una disminució aproximada del 50% tant en les cèl·lules positives per insulina com per glucagó, però se'n desconeix el mecanisme. Pel que fa al compartiment exocrí no s'observen canvis de mida ni funcionalitat, el que sí observen és una desorganització dels acinis, explicada pel paper de β -catenina en l'adhesió cel·lular.

A part d'aquest últim treball, la majoria de publicacions exposen que l'alteració de la via de senyalització Wnt/ β -catenina a través de la modulació de β -catenina dona com a resultat canvis clars en la mida del compartiment exocrí, sense observar diferències proliferatives del compartiment endocrí *in vivo*.

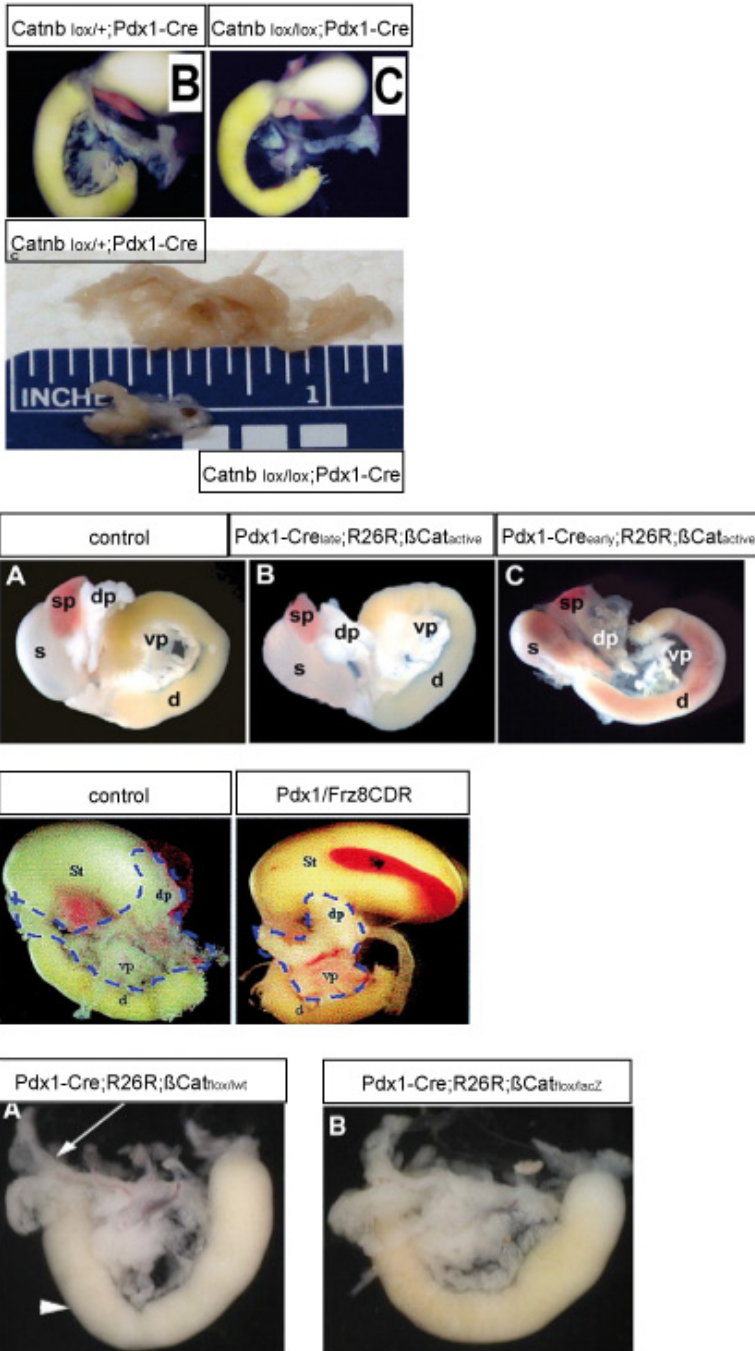


FIGURA 14. Morfologia pancreàtica dels diferents models transgènics emprats en els cinc estudis mencionats. (Dessimoz et al., 2005; Murtaugh et al., 2005; Papadopoulou et al., 2005; Heiser et al., 2006; Wells et al., 2007)

3.2.3 **MODULACIÓ D'ALTRES COMPONENTS DE LA VIA WNT**

Com que els resultats observats en els models animals, en els quals s'altera l'expressió del component clau de la via β -catenina, presenten el dubte de si els efectes observats tenen a veure amb el paper d'aquesta proteïna en l'adhesió cel·lular, els estudis on es modulen altres membres de la via poden aportar informació rellevant. Els treballs realitzats fins ara defineixen els efectes sobre l'organogènesi pancreàtica, així com també durant els estadis post-natals.

- Un estudi realitzat pel grup de Edlund (Papadopoulou and Edlund, 2005), utilitzant un model animal completament diferent, demostra que tant el compartiment endocrí com l'exocrí es veuen afectats amb l'alteració de la via Wnt/ β -catenina. En aquest cas, utilitzen un dominant negatiu de la proteïna de fusió Frz8, que funciona com a antagonista de la via Wnt evitant la unió del lligand Wnt al seu receptor Fzd. L'expressió d'aquesta proteïna és controlada pel promotor del gen de *Pdx1* (*Pdx1/Frz8CDR*). Els animals mutants presenten una disminució dràstica en la mida del pàncrees (veure figura 14) degut a una reducció de la taxa de proliferació dels progenitors pancreàtics, ja detectable molt aviat del desenvolupament pancreàtic, a l'estadi e11.5, i més evident en estadis més avançats. Els investigadors descarten la possibilitat que aquesta reducció en la mida del pàncrees, sigui deguda a un augment de l'apoptosi, a una diferenciació prematura o a problemes durant l'especificació pancreàtica. Tot i que la disminució pancreàtica afecta tant al compartiment endocrí com a l'exocrí, no en compromet la funció de cap dels dos i els animals mutants són normoglicèmics.

- Un altre component de la via utilitzat ha estat el co-receptor de la via, Lrp5. L'estudi del fenotip del model animal gen anul·lat per Lrp5 revela la possible implicació d'aquesta via en l'etapa adulta sobre el pàncrees, ja que aquests animals presenten una desregulació en el metabolisme de la glucosa i una secreció anòmala de la insulina estimulada per glucosa (GSIS, Glucose-stimulated insulin secretion) (Fujino et al., 2003).

- El treball del grup de Kim defensa la implicació de la via Wnt en el compartiment endocrí en estudis *in vitro*. Utilitzant estratègies de pèrdua i guany de funció demostren com la via de senyalització Wnt/ β -catenina controla la proliferació de les cèl·lules β , augmentant l'expressió de diferents components del cicle cel·lular (Rulifson et al., 2007).

- El gen *Pygopus* en *Drosophila* s'ha identificat com a component del complex nuclear β -catenina/Tcf/Lef. Els seus ortòlegs en ratolí són *mPygo1* i *mPygo2*, essent el segon essencial durant l'embriogènesi tal i com mostra l'animal gen anul·lat per aquest. En concret, aquests animals (*mPygo2*^{-/-}) moren en etapa perinatal, i els estudis a l'estadi e18.5 revelen una hipoplàsia pancreàtica que ja comença en etapes anteriors (a e13.5) i que afecta de manera específica la diferenciació del compartiment endocrí. Els autors demostren que aquests defectes són resultat d'una baixada en la taxa proliferativa dels progenitors pancreàtics. Per contra, el model animal específic per a l'epiteli pancreàtic *Pdx1-Cre;mPygo2*^{fllox/-} no revela cap fenotip pancreàtic, indicant que aquest component de la via participa en els senyals mesenquimals, que governen l'organogènesi pancreàtica (Jonckheere et al., 2008).

- Per últim, tenim el treball de Dabernat et al., que treballa amb un model animal deficient per β -catenina a la cèl·lula beta (*Catnb*^{lox/lox};RIP-Cre), suggererint que la via Wnt/ β -catenina participaria en el manteniment de la funció beta-pancreàtica. Alguns dels animals mutants moren entre el primer (P1) i el segon (P2) dia de vida. Els animals mutants, a l'estadi P1 són aparentment normals, però els animals que a *posteriori* moriran són hipoglicèmics i presenten defectes en la secreció d'insulina per part de les cèl·lules β , que tenen el doble de contingut d'insulina que les cèl·lules β dels animals control (Dabernat et al., 2009).

Finalment, cal exposar que existeixen dues línies transgèniques reporterres que s'utilitzen per a monitoritzar l'activitat de la via Wnt/ β -catenina. Per una banda tenim el model transgènic *conductin/axin-LacZ* en el que el locus de la diana gènica de la via Wnt, axina, és substituïda pel gen *lacZ* (Lustig et al., 2002). Per l'altra, tenim el model transgènic reporter *Bat-GAL* en el qual l'expressió del gen *lacZ* està sota l'expressió d'un promotor mínim (Maretto et al., 2003). Sorprenentment, en ambdós casos es demostra l'activitat de la via Wnt en les cèl·lules endocrines, però no en les exocrines durant el desenvolupament pancreàtic (revisat a (Dessimoz et al., 2006)).

Aquesta controvèrsia de resultats posa de manifest que, tot i que és clara la participació de la via en l'organogènesi pancreàtica i en l'etapa adulta, l'expressió espai-temporal de la senyalització Wnt/ β -catenina és molt important per a la correcta funcionalitat d'aquesta, i que depenent de l'estratègia metodològica utilitzada, s'obtidran uns resultats o uns altres.

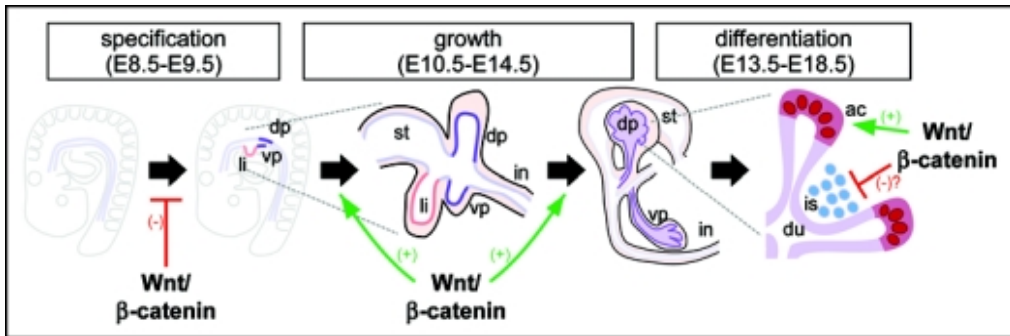


FIGURA 15. Estadis principals de l'organogènesi pancreàtica i la participació de la via Wnt/β-catenina en cadascun d'ells (Murtaugh, 2008).

3.3 ELS LLIGANDS WNT

En humans s'han identificat 19 gens que codifiquen per lligands Wnt, molts dels quals presenten una localització cromosòmica pròxima com per exemple *Wnt6* i *Wnt10a* que estan adjacents en el cromosoma 2, *Wnt1* i *Wnt10b* en el cromosoma 12 o *Wnt3a* i *Wnt9a* en el cromosoma 1 (revisat a (Miller, 2002)). En ratolí també s'han identificat 19 gens Wnt i també s'observa aquesta proximitat cromosòmica descrita en humans. Això suggereix la presència d'un clúster de gens Wnt en espècies ancestrals, comú en tots els vertebrats, que evolutivament ha sofert fenòmens de duplicació i que explicaria l'actual disposició cromosòmica dels gens Wnt compartida entre diferents espècies de vertebrats (Miller, 2002).

Els gens Wnt s'han identificat en vertebrats i invertebrats, però sembla que no existeixen en plantes, organismes unicel·lulars eucariotes ni procariotes. La majoria dels gens Wnt contenen 4 exons codificants, dels quals l'exó 1 conté el lloc d'iniciació a la traducció (TSS, translation start site).

La majoria de proteïnes Wnt comparteixen un 35% d'homologia amino-acídica, que augmenta en els casos dels membres de la mateixa numeració, com per exemple *Wnt3* i *Wnt3a*. En humans, les proteïnes Wnt són molt semblants en mida. Aquesta es mou entre els 39kDa (*WNT7a*) i els 46kDa (*WNT10a*). Són glicoproteïnes secretades molt insolubles i amb un alt contingut en residus de cisteïna, i majoritàriament es troben ancorades a la membrana cel·lular. L'extrem carboxiterminal sembla ser important pel que fa a l'especificitat funcional de la proteïna (Du et al., 1995), mentre

que l'extrem aminoterminal s'encarrega de la interacció específica amb el receptor corresponent. És en aquest extrem on es localitza el pèptid senyal de la proteïna necessari per al mecanisme de secreció d'aquesta (Dierick et al., 1999). Les proteïnes Wnt són dinàmicament modificades (modificacions lipídiques com per exemple la palmitoïlació) abans de la seva secreció, fet que és essencial per a la seva funció.

La funció de les molècules Wnt s'ha analitzat utilitzant diferents estratègies en diferents espècies, ratolí, *Xenopus*, *Drosophila*, *C. elegans*, etc. De fet els models transgènics en ratolí han ajudat a desxifrar millor les possibles funcions d'aquests lligands. En la taula 3 tenim un resum de cada lligand, del que se sap sobre la seva implicació en les diferents vies de Wnt i un resum dels fenotips observats en els models transgènics de cadascun d'ells (van Amerongen et al., 2006).

Poc se sap de la participació dels lligands Wnt en el desenvolupament pancreàtic. Els models transgènics per *Wnt2*, *Wnt4*, *Wnt6* o *Wnt7a* no presenten cap fenotip pancreàtic, però sí que ho fan dos models transgènics per *Wnt1* i *Wnt5a*. Per una banda, la sobreexpressió de *Wnt1* en progenitors pancreàtics Pdx1⁺ en etapes primerenques del desenvolupament pancreàtic es tradueix en una agènesi pancreàtica, mentre que per l'altra banda els animals Pdx1-*Wnt5a* presenten una hipoplàsia pancreàtica severa (Heller et al., 2002). Aquests resultats confirmen els altres estudis, revisats a l'apartat anterior, que descriuen la participació de la via Wnt en el desenvolupament pancreàtic.

SÍMBOL OFICIAL	ESTABILITZACIÓ DE LA β -Catenina	ACTIVACIÓ DE Pkc O CamkII	ACTIVACIÓ DE Rho O Rac	FENOTIP DEL MODEL GEN ANUL-LAT (van Amerongen and Berns 2006)
<i>Wnt1 (int-1, Wg)</i>	+ (Hinck <i>et al.</i> , 1994; van Leeuwen <i>et al.</i> , 1994; Shimizu <i>et al.</i> , 1997)	No demostrat	No demostrat	Defectes en el mesencéfal i romboencéfal
<i>Wnt2</i>	+ (Shimizu <i>et al.</i> , 1997; Bafico <i>et al.</i> , 1998; Karasawa <i>et al.</i> , 2002)	No demostrat	No demostrat	Defectes en el desenvolupament placentari
<i>Wnt3</i>	+ (Shimizu <i>et al.</i> , 1997; Barrow <i>et al.</i> , 2003)	No demostrat	+ (Kobune <i>et al.</i> , 2007)	Error en la formació de l'eix A/P abans de la gastrulació
<i>Wnt3a</i>	+ (Shimizu <i>et al.</i> , 1997)	No demostrat	+ (Shi <i>et al.</i> , 2006)	Eix A/P truncat
<i>Wnt4</i>	- (Shimizu <i>et al.</i> , 1997)	No demostrat	+ (Matsui <i>et al.</i> , 2005; Osafune <i>et al.</i> , 2006)	No formació de túbuls renals o ductes Mullerians
<i>Wnt5a</i>	- (Shimizu <i>et al.</i> , 1997)	+ (Slusarski <i>et al.</i> , 1997a; Kuhl <i>et al.</i> , 2000; Westfall <i>et al.</i> , 2003)	+ (Jopling and den Hertog, 2005; Zhu <i>et al.</i> , 2006; Hayashi <i>et al.</i> , 2007)	Eix A/P truncat, defectes en la morfogènesi pulmonar i pancreàtica
<i>Wnt5b</i>	- (Shimizu <i>et al.</i> , 1997)	No demostrat	No demostrat	Viable
<i>Wnt6</i>	+ (Shimizu <i>et al.</i> , 1997; Kirikoshi <i>et al.</i> , 2001)	No demostrat	No demostrat	Viable
<i>Wnt7a</i>	+ (Lucas and Salinas, 1997; Maye <i>et al.</i> , 2004)	No demostrat	+ (Kengaku <i>et al.</i> , 1998; Lyu and Joo, 2005)	Defectes en la formació de l'eix A/P; defectes en el tracte reproductor masculí i femení
<i>Wnt7b</i>	+ (Maye <i>et al.</i> , 2004) - (Shimizu <i>et al.</i> , 1997)	+ (Tu <i>et al.</i> , 2007)	+ (Rosso <i>et al.</i> , 2005)	Defectes en el desenvolupament placentari
<i>Wnt8a</i>	+ (Kelly <i>et al.</i> , 1995; Saitoh <i>et al.</i> , 2002; Katoh and Katoh, 2005)	No demostrat	No demostrat	Viable
<i>Wnt8b</i>	+ (Kelly <i>et al.</i> , 1995; Saitoh <i>et al.</i> , 2002; Katoh and Katoh, 2005)	No demostrat	No demostrat	Viable

<i>Wnt9a</i> (<i>Wnt14</i>)	+ (Spater <i>et al.</i> , 2006)	No demostrat	No demostrat	Defectes esquelètics i sinovials
<i>Wnt9b</i> (<i>Wnt15</i>)	+ (Park <i>et al.</i> , 2007)	No demostrat	No demostrat	Defectes urogenitals
<i>Wnt10a</i>	+ (Narita <i>et al.</i> , 2005)	No demostrat	No demostrat	No demostrat
<i>Wnt10b</i>	+ (Miyoshi <i>et al.</i> , 2002)	No demostrat	No demostrat	Diferenciació mioblàstica accelerada
<i>Wnt11</i>	+ (Kofron <i>et al.</i> , 2007)	+ (Koyanagi <i>et al.</i> , 2005; Matsui <i>et al.</i> , 2005)	+ (Marlow <i>et al.</i> , 2002; Matsui <i>et al.</i> , 2005; Zhu <i>et al.</i> , 2006)	Defectes renals i uretrals
<i>Wnt16</i>	+ (Mazieres <i>et al.</i> , 2005)	No demostrat	No demostrat	Viable

TAULA 3. Fenotips dels mutants per a cada un dels lligands de la via Wnt. Taula modificada de (Chien *et al.*, 2009)

3.3.1 **EL LLIGAND WNT9A**

Del lligand Wnt9a, també conegut com a lligand Wnt14, se'n sap relativament poc. S'ha descrit la seva expressió en diferents teixits de diferents espècies animals, però pel moment no s'ha publicat la seva presència en pàncrees i se'n desconeix quina és la seva funció específica.

El gen de *WNT9A* humà es localitza en el cromosoma 1q42, molt a prop del locus de *WNT3A*. L'anàlisi filogenètic de *Wnt9a* demostra que aquest gen està molt conservat entre espècies amb un percentatge d'identitat elevat entre humans, ratolí, pollastre, peix zebra i *Xenopus* (veure figura 16) (Curtin *et al.*, 2011).

Wnt9a està expressat en les cèl·lules progenitores de les unions cartilaginoses de ratolí i participa durant la condrogènesi sinovial (Koyama *et al.*, 2008). De fet els animals deficients en Wnt9a presenten defectes durant la formació dels condrocits i les unions cartilaginoses (veure apartat següent) (Spater *et al.*, 2006).

Recentment, s'ha publicat l'expressió de Wnt9a en intestí i teixit neural, com en el tracte òptic, en peix zebra (Cox *et al.*, 2010), així com també en els arcs faringis i estructures esquelètiques craniofacials. De fet, el bloqueig de l'expressió de Wnt9a

El lligand Wnt9a s'ha descrit com un activador de la via canònica de Wnt/ β -catenina utilitzant diferents models experimentals, tant *in vitro* com *in vivo*. Utilitzant el sistema reporter de la luciferasa TOP/FOP-Flash, explicat més endavant en l'apartat dels resultats, s'ha descrit que la sobreexpressió de Wnt9a indueix l'activitat de la via canònica de Wnt en cultius primaris de cèl·lules hepàtiques de ratolí, a nivells semblants als que ho fa el lligand canònic Wnt3a (Matsumoto et al., 2008). En aquest mateix treball demostren com el silenciament de Wnt9a resulta en la disminució dels nivells de β -catenina nuclear, al contrari del que s'observa amb la sobreexpressió de Wnt9a en condrocits (Spater et al., 2006). En altres contextos cel·lulars, explants de cèl·lules cardíques (Person et al., 2005) i en la línia cel·lular RCS de condrocits de rata (Guo et al., 2004), Wnt9a també és descrit com a activador de la via canònica.

Wnt9a s'ha relacionat amb el control de la proliferació cel·lular. S'han publicat diferents treballs on es demostra la participació de Wnt9a en processos proliferatius, però la utilització de models experimentals diferents dóna resultats contraposats. Per una banda, hi ha una única publicació on Wnt9a es descriu com un lligand anti-proliferatiu, induint un arrest del cicle cel·lular en fase G1/S (Xiang et al., 2008). Els altres treballs que relacionen Wnt9a amb proliferació, el defineixen com un lligand pro-proliferatiu, observant una hiperproliferació de l'epiteli hepàtic degut a la sobreexpressió de Wnt9a (Matsumoto et al., 2008), o un augment en la incorporació de BrdU (Bromodesoxiuridina) en explants cardíacs (Person et al., 2005).

Finalment, Wnt9a també s'ha relacionat amb el metabolisme hepàtic del glucògen i la glucosa (Matsumoto et al., 2008). En aquest estudi observen com el silenciament de Wnt9a en fetge, disminueix els nivells d'expressió de l'enzim Gys (Glycogen synthase) i augmenta els nivells de G6Pase (glucose-6-phosphatase), essencial per l'últim pas de la via de degradació del glucògen (i també per a la producció hepàtica de glucosa), provocant una disminució en els nivells hepàtics de glucògen. Aquests resultats indiquen que Wnt9a és necessari per a la supressió de l'expressió de G6Pase, així com també per conservar l'expressió de Gys per tal de mantenir nivells òptims de glucògen en hepatòcits en desenvolupament.

3.3.1.1. El model animal gen anul·lat per Wnt9a

El grup de Hartmann ha creat dos models animals per suprimir l'expressió de Wnt9a. En un d'ells s'han introduït dos llocs loxP que flanquegen l'exó 2 del gen de

Wnt9a i en l'altre s'ha introduït un cassette neomicina-lacZ (IRES-LacZ-FRT-neo) en l'exó2 del gen, donant com a resultat un transcrit aberrant que dona lloc a una proteïna no funcional (Spater et al., 2006).

Els dos models animals no es diferencien fenotípicament, i en aquesta tesi, per a l'anàlisi del fenotip pancreàtic s'ha utilitzat l'animal transgènic amb el cassette neomicina-lacZ (*Wnt9a^{lacZ/lacZ}*), cedit amablement pel grup de Hartmann.

Els animals mutants per *Wnt9a* moren a les poques hores de néixer degut a causes que encara no es coneixen. L'anàlisi histològic dels òrgans majoritaris (cor, pulmó, fetge, intestí, ronyó i cervell) no va revelar defectes importants que expliquessin les causes de la mort. Visualment són fàcilment identificables, són més petits que els seus germans control i la majoria de vegades no s'observa llet a l'estómac (veure figura 18).

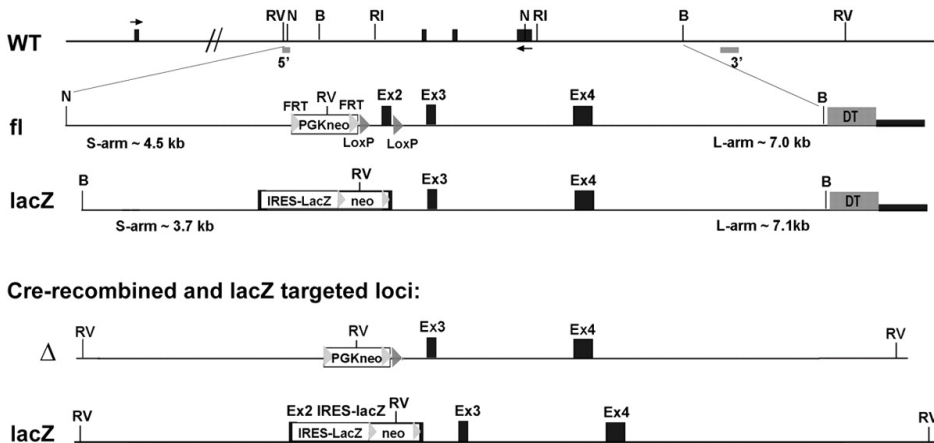


FIGURA 17. Esquema de construcció dels dos models transgènics de *Wnt9a*. (Spater et al., 2006)

L'estudi en profunditat d'aquests animals, tot i no presentar defectes esquelètics importants, revela defectes esquelètics minoritaris generalitzats, que s'observen tant en la formació de les extremitats com en el desenvolupament cranial erràtics.

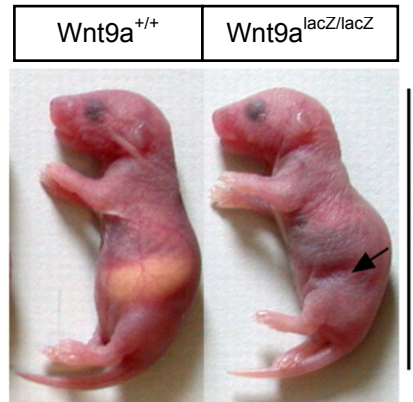


FIGURA 18. Imatge dels animals control (*Wnt9a*^{+/+}) i els animals deficients en *Wnt9a* (*Wnt9a*^{lacZ/lacZ}). S'observa una mida més reduïda en el cas dels animals mutants, assenyalat per les dues barres laterals, i l'absència de llet a l'estómac (fletxa) (Spater et al., 2006).

En el procés de condrogènesi hi intervé la via de senyalització Hh, i en aquest treball, gràcies al model gen anul·lat per *Wnt9a*, defineixen una modulació espai-temporal de l'expressió del lligand Indian Hedgehog (Ihh) per *Wnt9a*. Demostren com entre els estadis e12 i e13 de desenvolupament murí és essencial la presència de *Wnt9a* per mantenir els nivells d'expressió de Ihh necessaris per a la correcta formació de les extremitats òssies. En els animals mutants per *Wnt9a* observen una disminució en l'expressió de Ihh, que es tradueix en una disminució de la proliferació dels condrocits, així com en la maduració d'aquests, que té com a conseqüència un escurçament dels ossos dels apèndixs (Spater et al., 2006).

Finalment, relacionen l'acció de *Wnt9a* sobre el procés de condrogènesi amb la participació de la via canònica, ja que els animals gen anul·lats per *Wnt9a* tenen nivells inferiors de β -catenina. A més, ha estat descrita una relació directa entre β -catenina i Lef1 amb el promotor de Ihh in vitro, el que els ajuda a definir que la regulació de Ihh dependent de *Wnt9a* ve regulada per la via canònica Wnt/ β -catenina (Spater et al., 2006).

II. HIPÒTESI DE TREBALL I

OBJECTIUS

Durant els processos de diferenciació cel·lular a partir de progenitors pluripotents és necessària l'activació de cascades transcripcionals específiques. Addicionalment, també hi intervenen vies de senyalització les quals permeten i/o promouen l'inici i la progressió d'aquests programes transcripcionals.

El factor de transcripció bHLH Neurog3 inicia el programa transcripcional endocrí en el pàncrees. Se sap que diferents vies de senyalització intracel·lulars intervenen en el procés de diferenciació endocrina, però poc es coneix sobre les interaccions que existeixen entre ambdós processos. Dos estudis genòmics realitzats en el nostre laboratori i destinats a identificar gens regulats per Neurog3, i la seva diana Math6, van desemmascarar una possible connexió entre aquests factors transcripcionals i la via de senyalització Wntless (Wnt). La bibliografia existent sobre el paper d'aquesta via en l'ontogènia pancreàtica és controvertida. Mentre que la seva participació durant l'establiment del compartiment exocrí sembla clara, el seu paper durant la formació del pàncrees endocrí no està ben definida. Aquests resultats previs junt amb la recent identificació de polimorfismes en el gen efector de la via Wnt, Tcf7l2, com un dels factors de risc per a la diabetis tipus 2, ens va portar a postular que la via Wnt podria tenir un paper important en el procés de diferenciació endocrino-pancreàtica sota el control de Neurog3.

L'objectiu general d'aquesta tesi és **investigar la relació existent entre el programa transcripcional de diferenciació endocrina activat per Neurog3 i la via de senyalització Wnt.**

Els objectius concrets són els següents:

1. Identificar gens de la via Wnt regulats per Neurog3 i Math6 i potencialment implicats en el programa de diferenciació endocrino-pancreàtica

Estudiarem canvis globals en perfils d'expressió gènica en models cel·lulars de guany i pèrdua de funció dels gens bHLH Neurog3 i Math6, amb la finalitat d'identificar els gens relacionats amb la via de senyalització Wnt que són regulats per aquests dos factors, i comprovar-ne la seva expressió en pàncrees embrionari i en illots pancreàtics adults.

2. Investigar el paper del lligand Wnt9a en la formació de les cèl·lules endocrines del pàncrees

El lligand *Wingless-type MMTV integration site 9A* (Wnt9a) és un dels gens identificats en el primer objectiu com a diana comuna de Neurog3 i Math6. En aquest objectiu ens proposem:

- 2.1. Caracteritzar el patró d'expressió de Wnt9a durant l'embriogènesi pancreàtica.
- 2.2. Caracteritzar la regulació del gen de Wnt9a en resposta a Neurog3 i altres components de la cascada transcripcional endocrina, així com analitzar els seus efectes *in vitro* sobre el programa de diferenciació endocrina activat per Neurog3.
- 2.3. Determinar la funció de Wnt9a com activador de la via Wnt canònica en contextos cel·lulars pancreàtics.
- 2.4. Establir el paper *in vivo* de Wnt9a en la formació del pàncrees mitjançant l'estudi d'un model animal deficient per aquest lligand.

III. MATERIALS I MÈTODES

1. LÍNIES CEL·LULARS

1.1. MANTENIMENT DE LES LÍNIES CEL·LULARS

LÍNIA CEL·LULAR	MEDI DE CULTIU	SUPLEMENTS
mPAC: línia cel·lular pancreàtica ductal de ratolí	Dulbecco's Modified Eagles Medium (D-MEM) 4500mg/L de glucosa (Sigma-Aldrich)	<ul style="list-style-type: none"> • 10% FBS (Fetal Bovine Serum, (GibcoBRL) • 1% penicil·lina/estreptomicina (100U/ml, Cambrex)
HEK293: línia cel·lular embrionària de ronyó humana	Dulbecco's Modified Eagles Medium (D-MEM) 4500mg/L de glucosa (Sigma-Aldrich)	<ul style="list-style-type: none"> • 10% FBS (Fetal Bovine Serum, (GibcoBRL) • 1% penicil·lina/estreptomicina (100U/ml, Cambrex)
βTC3: línia cel·lular d'insulinoma de ratolí	Dulbecco's Modified Eagles Medium (D-MEM) 4500mg/L de glucosa (Sigma-Aldrich)	<ul style="list-style-type: none"> • 10% FBS (Fetal Bovine Serum, (GibcoBRL) • 1% penicil·lina/estreptomicina (100U/ml, Cambrex)
αTC6.1: línia cel·lular de glucagonoma de ratolí	Dulbecco's Modified Eagles Medium (D-MEM) 4500mg/L de glucosa (Sigma-Aldrich)	<ul style="list-style-type: none"> • 10% FBS (Fetal Bovine Serum, (GibcoBRL) • 1% penicil·lina/estreptomicina (100U/ml, Cambrex)
Min6: línia cel·lular d'insulinoma de ratolí	Dulbecco's Modified Eagles Medium (D-MEM) 4500mg/L de glucosa (Sigma-Aldrich)	<ul style="list-style-type: none"> • 10% FBS (Fetal Bovine Serum, (GibcoBRL) • 1% penicil·lina/estreptomicina (100U/ml, Cambrex) • 1% de L-Glutamina (Cambrex) • 50μM de β-mercaptoetanol
NIH3T3: línia cel·lular fibroblàstica de ratolí	Dulbecco's Modified Eagles Medium (D-MEM) 4500mg/L de glucosa (Sigma-Aldrich)	<ul style="list-style-type: none"> • 10% FCS (Fetal Calf Serum, (GibcoBRL) • 1% penicil·lina/estreptomicina (100U/ml, Cambrex)
NIH3T3-myc-Wnt9a: línia cel·lular fibroblàstica de ratolí que expressa Wnt9a de manera constitutiva	Dulbecco's Modified Eagles Medium (D-MEM) 4500mg/L de glucosa (Sigma-Aldrich)	<ul style="list-style-type: none"> • 10% FCS (Fetal Calf Serum, (GibcoBRL) • 1% penicil·lina/estreptomicina (100U/ml, Cambrex) • 0,3 mg/ml neomicina

TAULA 4. Línies cel·lulars i medis de cultiu utilitzats durant la tesi.

1.1.1. TRIPSINITZACIÓ I COMPTATGE

Totes les línies cel·lulars utilitzades són adherents i creixen en monocapa. De manera general es passen una o dues vegades per setmana a una ràtio de 1:10 o de 1:5 (en el cas de les β TC3 i les Min6) quan provenen d'un flascó de 75cm².

Protocol (flascó de 75cm²):

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

1.1.2. CRIOPRESERVACIÓ DE CÈL·LULES

Protocol (flascó de 75cm²):

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

1.1.3. DESCONGELACIÓ DE CÈL·LULES

Protocol (flascó de 75cm²):

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

1.2. GENERACIÓ DE LA LÍNIA CEL·LULAR ESTABLE NIH3T3-MYC-WNT9A

1.2.1. CREACIÓ

1. Inicialment hem clonat el cDNA corresponent de la regió codificant del lligand Wnt9a, unit a una cua myc en el seu extrem 3', dins el vector d'expressió pCDNA3.1^{+/+}, que codifica pel gen que confereix resistència a neomicina, utilitzant els llocs de restricció EcoRI- XbaI.
2. En paral·lel testem la resistència inherent de les cèl·lules NIH3T3 a la neomicina mirant quantitats creixents d'antibiòtic (de 0.2mg/ml a 1.2 mg/ml) i quantitats creixents de concentració cel·lular (de 2.000 cèl·lules/pou a 1 cèl·lula/pou) en una placa de 96 pous. Amb aquesta anàlisi establim una concentració òptima per a la selecció de 0.8mg/ml i una concentració cel·lular de 8 cèl·lules/pou).

3. Plaquegem 150.000 cèl·lules/pou en una placa de 12 pous i al cap de 24 hores transfectem el vector pCDNA3.1^{+/+} amb Transfast (Promega) seguint les indicacions del protocol. Posem 2µg de DNA, 6µl de transfast i 0.5ml de medi (sense sèrum) i fem un vòrtex de 3-5 segons. Deixem 20 minuts a temperatura ambient i afegim la mix a les cèl·lules. Deixem 2 hores a 37°C i afegim 1.2ml de medi. 48 hores després de la transfecció afegim neomicina a una concentració de 0.8mg/ml i canviem el medi cada dia.
4. Després d'una taxa de mort elevada a l'inici, s'observa un increment en el nombre de cèl·lules passats uns 7-10 dies, que majoritàriament seran les cèl·lules seleccionades positivament, moment en el que tripsinitzem i passem a una placa de 96 pous, plaquejant 8 cèl·lules/pou i amb 0.8mg/ml de neomicina.
5. Passats uns 10-15 dies tripsinitzem les cèl·lules de diferents pous (considerarem cada pou com a un clon), i les passem a una placa de 12 pous per amplificar (tindrem 12 clons diferents en total).
6. Deixem que creixin fins a confluència i ho passem a un flascó de 25cm² i baixem la concentració d'antibiòtic a 0.3mg/ml.
7. Un cop arriben a confluència fem extracció de RNA per testar els nivells d'expressió de Wnt9a.

1.3. ASSAJOS LUCIFERASA

Els sistemes reporters amb el gen *luc* (Promega) permeten l'estudi de seqüències reguladores de la transcripció eucariota. Es realitza una transfecció transitòria en cèl·lules en cultiu i es poden detectar els efectes transcripcionals sobre el gen *luc* mesurant els nivells d'activitat luciferasa de la cuca de la llum (*Photinus pyralis*). Aquesta activitat és pràcticament absent en les cèl·lules de mamífer, de manera que la luminescència detectada en els lisats cel·lulars és directament proporcional a l'activitat promotora de la construcció transfectada.

1.3.1. TRANSECCIONS TRANSITÒRIES

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

1.3.1.1. *Cèl·lules mPAC*

Protocol (placa de 96 pouets):

1. Plantar 15000cèl·lules/pouet 24h abans de la transfecció
2. Fer la barreja dels vectors reporters segons procedeixi: TOP-Flash (250ng/pou), FOP-Flash (250ng/pou) i pRL-CMV (2.5ng/pou)
3. Incloure els vectors d'expressió corresponents: PCIG, PCIG-βcatenina, PCIG-Wnt3a, pCMVTnt, pCMVTnt-Wnt9a i pCMVTnt-Wnt7b tots ells a 5ng/pou, pCMVTnt-flag.Neurog3 i pCMVTnt-myc.Math6 a 10ng/pou.
4. Afegir a la barreja 25µl/pou de DPBS
5. Barrejar el Metafectene PRO (Biontex) a 0.5µl/pou, pipetejant una única vegada
6. Deixar incubant la barreja a temperatura ambient durant 30-40min
7. Afegir la barreja als pous corresponents i deixar 48h a 37°C
8. Procedir a l'anàlisi de l'activitat luciferasa

1.3.1.2. Cèl·lules HEK293

Protocol (placa de 96 pouets):

1. Plantar 20000cèl·lules/pouet 24h abans de la transfecció
2. Fer la barreja dels vectors reporters segons procedeixi: TOP-Flash (250ng/pou), FOP-Flash (250ng/pou) i pRL-CMV (2.5ng/pou)
3. Incloure els vectors d'expressió corresponents: PCIG, PCIG- β catenina, PCIG-Wnt3a, pCMVTnt, pCMVTnt-Wnt9a i pCMVTnt-Wnt7b tots ells a 5ng/pou, pCMVTnt-flag.Neurog3 i pCMVTnt-myc.Math6 a 10ng/pou
4. Afegir a la barreja 50 μ l/pou de medi sense complementar (sense FBS ni P/S)
5. Barrejar el Transfast (Promega) a 0.5 μ l/pou, fent un vòrtex d'uns 3-5 segons
6. Deixar incubant la barreja a temperatura ambient durant 20min
7. Treure el medi de les cèl·lules i afegir la barreja als pous corresponents i deixar 2h a 37°C
8. Afegir 150 μ l/pou de medi complementat i deixar 24h a 37°C
9. Procedir a l'anàlisi de l'activitat luciferasa

1.3.2. **ASSAIG DUAL D'ACTIVITAT LUCIFERASA RENILLA**

Les cèl·lules transfectades van ser tractades per tal de ser assajades amb el kit comercial Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega), seguint les instruccions de la casa comercial. Les mesures de luminescència es van realitzar en un luminòmetre Veritas (Turner Biosystems).

Protocol (placa de 96 pouets):

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

2. DNA

2.1. AMPLIFICACIONS DE DNA-ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

2.1.1. **PCR CONVENCIONAL**

Les PCRs (*polymerase chain reaction*, reacció en cadena de la polimerasa) convencionals, és a dir, sense realitzar un seguiment cicle a cicle, tal i com es realitza en les PCRs a temps real, es va utilitzar per: comprovar que l'insert d'un adenovirus és

correcte, estudis d'expressió gènica en diferents experiments i línies cel·lulars, genotipatges, etc. És una tècnica general que s'adaptarà a cada situació.

Protocol:

1. Afegir a un tub de 0.2ml:

Mescla de dNTPs a 10mM (GeneCraft)	1 µl
Mescla d'encebadors a 10µM.....	2 µl
Tampó de reacció Taq polimerasa10x	2.5 µl
MgCl ₂ (50mM)	0.75µl (1,5mM)
cDNA	2µl*
Taq polimerasa (GeneCraft).....	0.5 µl
Aigua	16.25 µl*

*volums variables
2. Mesclar i centrifugar breument per baixar el contingut
3. Introduir en el termociclador aquestes condicions:
 - 94°C-----5min
 - 30-38 cicles de:
 - 94°-----30s (fase de desnaturalització)
 - 55-65°C-----30s (fase d'anellament)
 - 72°C-----1min (fase d'extensió, que depèn de la longitud del transcrit (norma general 1Kb/1min))
 - 72°C-----5min
 - 4°C-----∞

2.1.2. PCR A TEMPS REAL

La tècnica de PCR a temps real ens permet observar com es van amplificant els diferents transcrits cycle per cycle. Existeixen diverses formes per tal de fer aquest seguiment amb diferents fluoròfors i encebadors, encara que en aquesta tesi hem emprat únicament el fluoròfor SYBRgreen. Aquest s'uneix a doble cadena de DNA, de tal manera que quanta més amplificació del transcrit tinguem, major fluorescència observarem.

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

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

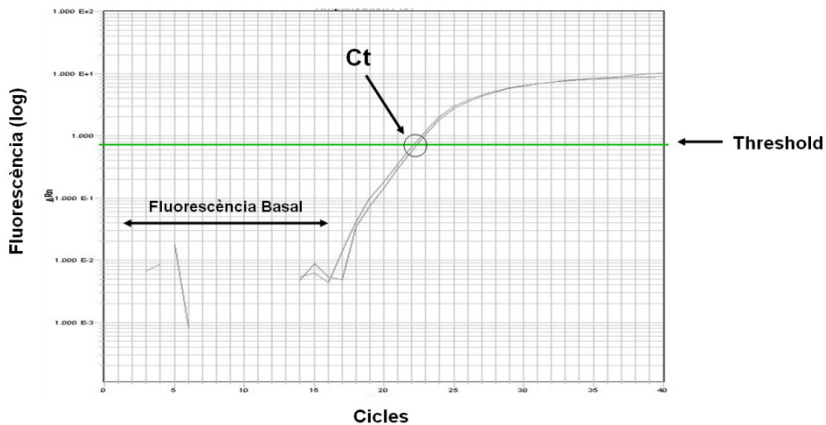


FIGURA 19. Gràfica d'amplificació d'una PCR a temps real. L'eix vertical representa la quantitat de fluorescència normalitzada, i l'eix horitzontal el nombre de cicles. La fluorescència basal es refereix als cicles inicials en els que no hi ha canvis detectables en la quantitat de fluorescència. El *threshold* és el llindar on es produeix un canvi significatiu de la fluorescència i el tall entre aquest llindar i la corba d'amplificació determina el Ct o el cicle llindar, el qual s'utilitza per quantificar. El càlcul de la Ct sempre es realitza en la fase exponencial de la corba.

Protocol:

1. Afegir per pou de placa de 96 pouets per a PCR a temps real (Applied Biosystems):
 - SYBRGreen Master Mix 2x (Applied Biosystems) 5 μ l
 - Mescla d'encebadors a 10 μ M 0.25 μ l
 - cDNA 4 μ l
 - H₂O destil·lada 0.75 μ l
2. Centrifugar breument per baixar el contingut
3. Introduir al termociclador 7900HT (Applied Biosystems) amb les condicions predeterminades:
 - 50°C-----2min
 - 5°C-----10min
 - 40 cicles de:
 - 95°C-----15s (fase de desnaturalització)
 - 60°C-----1min (fase d'anellament i extensió)
 - 95°C-----15s
 - Increment de 60°C a 95°C a una velocitat d'uns 1.92°C/min (fase de corba de dissociació)

Aquesta tècnica mesura la fluorescència total de les cadenes dobles de DNA unides a SYBRgreen. Aquest fet provoca que, si apareixen diversos transcrits durant l'amplificació, la fluorescència observada serà la total de tots els transcrits. Afegint la

fase de corba de dissociació podem veure l'especificitat dels encebadors, i en el cas que aparegui més d'un pic de fluorescència (és a dir, més d'un transcrit) la millor opció serà dissenyar uns nous encebadors més específics per al gen d'interès.

2.1.3. VALIDACIÓ ENCEBADORS

El disseny i validació dels encebadors d'un gen específic és de summa importància degut al mètode de quantificació que utilitzem (mètode $\Delta\Delta Ct$). Uns resultats reproduïbles requereixen que l'eficiència del nostre gen control i del nostre gen problema siguin el més similars possible. Les eficiències acceptables per als encebadors emprats són d'un mínim del 85%, i aquesta eficiència es calcula a partir de la pendent d'una corba estàndard realitzada per testar aquest parell d'encebadors (**Eficiència = $[10^{(-1/pendent)} - 1]$**).

2.2. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

2.2.1. SEPARACIÓ DE TRANSCRITS DE DNA EN AGAROSA

Els gels d'agarosa permeten separar les amplificacions realitzades per PCR segons la seva mida. En funció del percentatge d'agarosa que continguin, les bandes migraran a diferents velocitats. D'aquesta manera un gel amb un percentatge elevat d'agarosa (3%) s'utilitza per separar bandes d'una mida inferior a 200pb (parells de bases), mentre que un gel de percentatge baix (0.5%) és per observar bandes d'una mida superior a 1kb.

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

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

1. Afegir en un erlenmeyer de vidre:
 - Solució TAE (Tris, acètic i EDTA) 1x..... 50ml
 - Agarosa (Sigma)..... 0.5g
2. Escalfar al microones fins que l'agarosa es dissolgui
3. Deixar que es refredi una mica sense que s'iniciï la polimerització i afegir 2.5µl de Midori Green DNA Stain (NIPPON Genetics)
4. Traspasar la preparació a una safata de polimerització i deixar solidificar amb una pinta per formar els pouets
5. Una vegada solidificat, retirar la pinta i col·locar la safata en una cubeta amb tampó TAE 1x
6. Carreguem un marcador de pes molecular (que ens permet tenir una referència del pes de les bandes observades) i a continuació carreguem les mostres. En alguns casos haurem d'afegir tampó de càrrega blau/taronja 6x

7. Sotmetem el gel a una potència d'uns 80-110V, fins que el front avanci suficientment per poder distingir les bandes i observar-les amb un transil·luminador de llum ultraviolada

Solucions utilitzades:

Tampó TAE 50x

Tris(hidroximetil)aminometà (Serva).....	242g
Àcid acètic glacial (Panreac)	57.1ml
Na ₂ EDTA.2H ₂ O (Sigma)	37.2g
H ₂ O destil·lada	1L

2.2.2. PURIFICACIÓ DE BANDES D'AGAROSA

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

Protocol:

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

2.3. VECTORS D'EXPRESSIONI

Els vectors o plasmidis ens permeten sobreexpressar o silenciar gens, crear adenovirus etc. Per a poder crear un vector d'expressió s'han de seguir unes passes generals

2.3.1. AMPLIFICACIÓ PER A LA CLONACIÓ DE GENS

2.3.1.1. *Expand High Fidelity PCR System*

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

Protocol:

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

Mescla de dNTPs a 10mM	1µl
Mescla d'encebadors a 10µM	2µl
Tampó de reacció de High Fidelity amb MgCl ₂ 15mM 10x.....	5µl
DNA.....	2µl
Expand High Fidelity enzyme mix	0.75µl (2.6U)
H ₂ O destil·lada	39.25µl

2. Mesclar amb la pipeta i centrifugar breument

3. Introdur al termociclador en aquestes condicions:

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

2.3.2. DIGESTIÓ DE VECTORS

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

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

Protocol (orientatiu):

- Afegir en un tub:

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

2.3.3. L·LIGACIÓ DE FRAGMENTS

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

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

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

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

Protocol:

- Afegir al tub de 0.5 ml:

Vector tallat i purificat.....	30ng
Insert tallat i purificat	Xng
Tampó de lligació 5x.....	2µl
T4 DNA ligasa (5 U) (Invitrogen)	1µl
H ₂ O destil·lada.....	fins 10µl
- Deixar la preparació a 16°C durant 16 hores

2.3.4. CLONACIÓ DE FRAGMENTS DE PCR

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

Aquest kit conté un vector pGEM-T Easy que està obert i presenta extrems protuberants 3' amb una timidina, fet que permet la seva no recircularització i que es puguin lligar els fragments que es volen clonar. A més a més, el lloc d'obertura d'aquest vector, és al mig del gen *LacZ* que codifica per a la β -galactosidasa. Quan es clona satisfactòriament un gen, es crea un gen aberrant de *LacZ* i no es produeix l'expressió d'una β -galactosidasa funcional. D'aquesta manera se'ns facilita la selecció de clons que expressen el vector amb el nostre fragment d'interès.

Protocol:

1. Afegir en un tub:

Vector pGEMT-easy	0.5 μ l
Insert tallat i purificat	1/2 μ l
Tampó de lligació ràpida 2x	5 μ l
T4 DNA ligasa	1 μ l (3U)
H ₂ O destil·lada	fins 10 μ l
2. Deixar la preparació a 16°C durant 16 hores

2.3.5. TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS COMPETENTS

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

Protocol:

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

Solucions utilitzades:LB (Luria-Bertani medium)

1. Afegir a una proveta (per fer 0.5 litre):

Bacto-triptona (Becton Dickinson)	5g
Bacto yeast extract (Becton Dickinson).....	2.5g
NaCl (Serva)	5g
H ₂ O destil·lada.....	fins 500ml
2. Ajustar el pH a 7.4 amb una solució de NaOH
3. Autoclavar per esterilitzar

LB agar

1. Afegir:

LB sense autoclavar	500ml
Bacto-agar (Becton Dickinson)	7.5g
2. Autoclavar per esterilitzar
3. Quan es refredi (sense que arribi a polimeritzar) afegir ampil·lina (Normon) a una concentració final de 100µg/ml
4. Prop de la flama, traspasar el LB agar sense polimeritzar a plaques de Petri (Soria Genlab) i deixar refredar fins la seva completa polimerització
5. Conservar les plaques a 4°C

LB agar – X-gal/IPTG

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

2.3.6. AMPLIFICACIÓ (CREIXEMENT DE BACTERIS EN MEDI LÍQUID)

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

Deixem créixer el cultiu bacterià durant aproximadament 12h (tota la nit), on obtindrem un caldo de cultiu tèrbol, el que vulgarment anomenaríem "mini". Si desitgem amplificar més el cultiu, traspasarem el contingut del tub en un ambient estèril a una ampolla o erlenmeyer estèril que contingui 100ml LB ampil·lina (midiprep) o més de 150ml (maxiprep).

2.3.7. PURIFICACIÓ DE PLASMIDIS BACTERIANS

2.3.7.1. *A petita escala o processament de minipreps*

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

Protocol:

1. Centrifugar 1.5ml de brou de cultiu durant 2min a 12.000rpm
2. Treure el sobrenedant i afegir al pèl-let de bacteris 100µl de solució I, deixar 1min (conté DNasa)
3. Afegir 200µl de solució II, homogeneïtzar bé i incubar 1min
4. Afegir 350µl de solució III, homogeneïtzar la mescla i incubar 1min
5. Centrifugar durant 5min a 12.000rpm
6. Transferir el sobrenedant a la columna
7. Centrifugar durant 2min a 10.000rpm
8. Afegir 500µl de solució de rentat
9. Centrifugar durant 2min a 10.000rpm
10. Repetir els passos 8 i 9
11. Centrifugar durant 1min a 8.000rpm per extreure de la columna restes líquides
12. Afegir 35µl de solució EB (elution buffer) al centre de la columna i incubar durant 2min
13. Canviar el tub recol·lector
14. Centrifugar durant 2min a 10.000rpm
15. Quantificació de la mostra

2.3.7.2. *A mitjana (midiprep) o gran escala (maxiprep)*

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

Protocol:

1. Centrifugar 150ml de maxi en tubs de 50ml a 6000g, durant 15min a 4°C
2. Eliminar el sobrenedant per decantació i re-suspendre el pèl-let en 10ml de tampó P1
3. Afegir 10ml de tampó P2 i agitar per inversió 4 o 5 vegades
4. Incubació a temperatura ambient durant 5min
5. Afegir 10ml de tampó P3 i agitar per inversió 4 o 5 vegades
6. Incubar en gel durant 20min
7. Centrifugar a $\geq 20.000g$ durant 30min a 4°C
8. Traspasar sobrenedant, amb la precaució de no arrossegar cap residu sòlid al nou tub
9. Centrifugar a $\geq 20.000g$ durant 15min a 4°C
10. Afegir a una columna QIAGEN-tip 500 10ml del tampó d'equilibració QBT, menyspreant l'eluent
11. Afegir a la columna els 30ml de sobrenedant obtinguts de l'última centrifugació, amb la precaució de no arrossegar cap residu sòlid
12. Menysprear l'eluent
13. Afegir 30ml del tampó QC a la columna
14. Menysprear l'eluent
15. Afegir 30ml del tampó QC a la columna
16. Menysprear l'eluent
17. Afegir 15ml del tampó QF i recollir l'eluent en un tub nou
18. Afegir 10.5ml d'isopropanol i agitar per a la seva completa homogeneïtzació
19. Incubar 30min a -20°C
20. Centrifugar a $\geq 15.000g$ durant 30min a 4°C

21. Eliminar sobrenedant
22. Afegir 400µl d'etanol 70% i re-suspendre el pèl·let
23. Traspasar els 400µl a un tub eppendorf
24. Afegir 400µl més d'etanol 70% al tub i recollir el que quedi de pèl·let
25. Traspasar a l'eppendorf
26. Centrifugar a $\geq 15.000g$ durant 10min a 4°C
27. Eliminar el sobrenedant amb compte de no desenganxar el pèl·let
28. Deixar assecar a temperatura ambient per eliminar les restes d'etanol
29. Re-suspendre en uns 200µl de TE

2.3.8. AMPLIFICACIÓ PER A SEQÜENCIACIÓ

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

Protocol:

1. Afegir en un tub eppendorf:

Mostra de DNA	0.35µg
Terminator ready reaction mix	2µl
H ₂ O	fins 10µl
2. Mesclar amb la pipeta i centrifugar per baixar el contingut al fons del tub
3. Introduir al termociclador aquestes condicions:

96°C-----	5min
25 cicles de:	
96°C-----	10seg
50°C-----	5seg
60°C-----	4min
60°C-----	5min
4°C-----	∞
4. En finalitzar la reacció afegir 10µl més d' H₂O

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

2.4. VECTORS D'EXPRESSIÓ CREATS

2.4.1. pCMVTnt-Wnt9a

Es va amplificar la seqüència de Wnt9a per PCR, a partir de cDNA de cervell de ratolí d'estadi e17.5 de desenvolupament, utilitzant els encebadors indicats a la taula de l'annex. Un cop amplificat es va clonar dins del vector pGEM-T per després clonar-lo dins del vector d'expressió pCMVTnt utilitzant les dianes de restricció EcoRI (5') i XbaI (3').

2.4.2. **pCMVTnt-Wnt7b**

Es va amplificar la seqüència de Wnt7b per PCR, a partir de cDNA de pàncrees de ratolí d'estadi e15.5 de desenvolupament, amb els encebadors indicats a la taula de l'annex. Un cop amplificat es va clonar dins del vector pGEM-T per després clonar-lo dins del vector d'expressió pCMVTnt utilitzant les dianes de restricció EcoRI (5') i XbaI (3').

2.4.3. **PAC.CMV-Wnt9a**

Es va amplificar la seqüència de Wnt9a a partir de cDNA de cervell de ratolí d'estadi e17.5 de desenvolupament amb els encebadors indicats a la taula de l'annex. Un cop amplificat es va clonar dins del vector pGEM-T per després clonar-lo dins del vector d'expressió PAC.CMV utilitzant les dianes de restricció EcoRI (5') i XbaI (3').

2.4.4. **pCDNA3.1-myc.Wnt9a**

Es va amplificar la seqüència de Wnt9a a partir de cDNA de cervell de ratolí d'estadi e17.5 de desenvolupament amb els encebadors indicats a la taula de l'annex. Un cop amplificat es va clonar dins del vector pGEM-T per després clonar-lo dins del vector d'expressió pCDNA3.1 utilitzant les dianes de restricció EcoRI (5') i XbaI (3').

2.5. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (ChIP)

La Immunoprecipitació de Cromatina és un mètode bioquímic usat principalment per a determinar la localització en el genoma d'histones modificades i d'altres proteïnes *in vivo*. Aquesta tècnica consisteix en l'ús d'un anticòs que reconeix la proteïna d'interès.

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

Protocol:1. A) Crosslinking cèl·lules:

- 1.1. Rentar les cèl·lules amb 10ml de DPBS 1x
- 1.2. Afegir 9ml de 1% formaldehid i incubar 15min a temperatura ambient en agitació
- 1.3. Neutralitzar la reacció afegint 1ml de 1.25M Glicina i deixar durant 3-5min
- 1.4. Rentar dues vegades la placa amb DPBS 1x fred
- 1.5. Afegir 1ml de DPBS i rascar les cèl·lules de la placa
- 1.6. Centrifugar a 2000gx durant 5min a 4°C

1. B) Crosslinking teixits:

- 1.1. Fem extracció de teixit pancreàtic embrionari a e14.5, col·locant un mínim de 8 primordis pancreàtics per tub
- 1.2. Rentar els primordis amb 10ml de DPBS 1x
- 1.3. Afegir 9ml de 1% formaldehid i incubar 15min a temperatura ambient en agitació
- 1.4. Neutralitzar la reacció afegint 1ml de 1.25M Glicina i deixar durant 3-5min
- 1.5. Rentar dues vegades els primordis amb DPBS 1x fred
- 1.6. Centrifugar a 2000gx durant 5min a 4°C

2. Extracció de la cromatina

- 2.1. Re-suspendre el pèl·let de cèl·lules amb 1ml de tampó de lisi I i incubar 10min en gel
En el cas dels primordis, homogeneïtzar la mostra amb un homogeneïtzador manual
- 2.2. Centrifugar a 1000gx durant 5min a 4°C
- 2.3. Re-suspendre el pèl·let amb 300-400µl del tampó de lisi II i incubar 10min en gel
3. Fase de sonicació o fragmentació de la cromatina
 - 3.1. Sonicar per un total de 50-60seg, repartit en 5-6 torns a una potència de 7 (BRANSON-Sonifier150) Reposar mínim 1min en gel entre torns de sonicació
 - 3.2. Centrifugar a 10.000gx durant 15min a 4°C
 - 3.3. Recollir sobrenedant *
 - 3.4. En aquest pas es pot congelar la cromatina i mantenir a -80°C per continuar un altre dia (es estable fins una setmana a 4°C) o continuar amb el protocol

4. Immunoprecipitació de la cromatina

- 4.1. Diluir la cromatina amb tampó de dilució
- 4.2. Quantificar el DNA
- 4.3. Emprar 100-200µg cromatina per condició d'immunoprecipitació en un volum final de 500-1000µl. (**IMPORTANT:** Guardar una part de cromatina diluïda per utilitzar com a control de precipitació (input); 50µl si el volum d'immunoprecipitació és de 500µl)
- 4.4. Afegir 2-5µg d'anticòs específic (en paral·lel tindrem un tub on immunoprecipitem amb anticòs control, IgG de l'espècie de l'anticòs específic)
- 4.5. Incubar en rotació durant tota la nit a 4°C (aproximadament 16h)
5. Acoblar l'anticòs primari a les beads magnètiques (Dynabeads® Invitrogen)
 - 5.1. Afegir 25ml de *Dynabead* per condició prèviament rentades amb DPBS
 - 5.2. Incubar 2-3h en rotació a 4°C

6. Rentats

- 6.1. Utilitzant el suport magnètic extreure el sobrenedant i rentar amb 1ml de tampó de rentat baix en sals deixant en rotació durant 4min
- 6.2. Rentar amb 1ml de tampó de rentat alt en sals deixant en rotació durant 4min
- 6.3. Rentar amb 1ml de tampó de rentat amb LiCl deixant en rotació durant 4min
- 6.4. Rentar 3 vegades amb tampó TE deixant en rotació durant 4min en cada rentat

7. Elució

- 7.1. Precipitar les *beads* amb el suport magnètic, treure sobrenedant i afegir 250µl de solució d'elució
- 7.2. Incubar en rotació durant 15min a temperatura ambient
- 7.3. Guardar el sobrenedant i repetir els dos passos anteriors
- 7.4. Tenim un volum final de 500µl

8. Crosslinking revers

8.1. En aquesta fase també afegim els inputs on per tenir el mateix volum que als eluïts afegim tampó d'elució fins arribar a 500µl

8.2. Afegim 20µl de NaCl 5M a cada tub

8.3. Incubar a 65°C 4-16 h

9. Digestió amb proteinasa K

9.1. Afegir : 20µl Tris pH 6.5 1M

10µl EDTA 0.5M

2µl proteinasa K 20mg/ml

9.2. Incubar durant 2h a 45°C

10. Recuperació del DNA

10.1. Purificar la cromatina emprant el kit Quiquick (Qiagen)

***Comprovar la mida de la cromatina**

- 5µl extracte
- 35µl H₂O₂
- 1µl 0.5M EDTA
- 2µl proteinasa K

Mantenir 1h a 45 °C

Revelar en un gel d'agarosa al 1%

Solucions utilitzades:Tampó de lisi I

- Hepes pH7.5 0.05M
- NaCl 0.14M
- EDTA 1mM
- Glicerol 10%
- NP-40 0.5%
- Tritó-X-100 0.25%
- Inhibidor de proteases 1x

Tampó de lisi II

- Tris pH8.1 50mM
- EDTA 10mM
- SDS 1%
- Inhibidor de proteases 1x

Tampó de dilució

- Tris pH8 21mM
- EDTA 2.2mM
- NaCl 167mM
- Tritó-X-100 1.1%
- SDS 0.01%
- Inhibidor de proteases 1x

Tampó de rentat baixa en sals

- Tris pH8 20mM
- NaCl 150mM
- EDTA 2mM
- Tritó-X-100 1%
- SDS 0.1%

Tampó de rentat alt en sals

- Tris pH8 20mM
- NaCl 500mM
- EDTA 2mM
- Tritó-X-100 1%
- SDS 0.1%

Tampó de rentat amb LiCl

- Tris pH8 10mM
- LiCl 0.25M
- EDTA 1mM
- NP-40 1%
- Deoxicolat de sodi 1%

Tampó TE

- Tris pH8 10mM
- EDTA 1mM

Tampó d'elució

- SDS 1%
- NaHCO₃ 0.1M

3. RNA

3.1. EXTRACCIÓ DE RNA

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

Tres mètodes diferents d'extracció de RNA han estat utilitzats: el TRIzol® (Invitrogen), l'extracció mitjançant columnes de QIAGEN (RNeasy mini o micro kit) i l'extracció per fenol/cloroform, ja sigui per cultius cel·lulars, teixits embrionaris i/o adults.

3.1.1. MÈTODE DE PURIFICACIÓ PER TRIZOL

Aquest mètode es basa en la separació en una bifase aquosa-orgànica, seguida de precipitació. Es va emprar majoritàriament per cèl·lules en cultiu i també per alguns teixits (no pàncrees). Una vegada recollides les mostres i ben homogeneïtzades poden no processar-se i conservar-se a -80°C fins el seu ús.

Protocol:1. Homogeneïtzació de cèl·lules en cultiu

- 1.1. Aspirar el medi de cultiu de les cèl·lules i fer un rentat amb DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline-Sigma)
- 1.2. Posar la placa sobre una superfície freda i afegir el volum adequat de TRIzol en funció de la placa (1ml per una de 10cm²)
- 1.3. Pipetejar varies vegades el volum fins que les cèl·lules es desenganxin i recollir el contingut en un tub eppendorf

2. Homogeneïtzació de teixits

- 2.1. Afegir TRIzol en un tub Falcon de 15ml en quantitat suficient per al teixit que es desitgi processar (100mg teixit- 1ml TRIzol)
- 2.2. Homogeneïtzar la mostra amb un homogeneïtzador tipus Ultra turrax (IKA-WERKE®, Ultra turrax T8-10) o similar a una velocitat adequada per evitar l'escalfament de la mostra

3. Separació de fases

- 3.1. Incubar la mostra amb TRIzol durant 5min a temperatura ambient
- 3.2. Afegir 0.2ml de cloroform per cada ml de TRIzol utilitzat en l'homogeneïtzació i agitar durant 15s
- 3.3. Incubar 3min a temperatura ambient i centrifugar 15min a 12.000g a 4°C
- 3.4. Recollir la fase superior (aquosa) i transferir-la a un nou tub

4. Precipitació de l'RNA

- 4.1. Afegir 0.5ml d'isopropanol per cada ml de TRIzol inicial i incubar les mostres 10min a temperatura ambient
- 4.2. Centrifugar a 12.000g durant 10min a 4°C

5. Rentat de l'RNA

- 5.1. Eliminar el sobrenedant i afegir 1ml d'etanol 70% per ml de TRIzol inicial
- 5.2. Agitar la mostra i centrifugar a 7.500g durant 5min a 4°C

6. Redissolució de l'RNA

- 6.1. Eliminar el sobrenedant amb compte de no desenganxar el pèl·let del fons
- 6.2. Deixar assecar a temperatura ambient el pèl·let
- 6.3. Re-suspendre el pèl·let amb H₂O lliure de RNases (quantitat variable en funció de la quantitat d'RNA extreta)

3.1.2. MÈTODE DE PURIFICACIÓ PER COLUMNES (RNEASY MINI KIT)

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

Protocol:1. Homogeneïtzació

- 1.1. Partir d'un pèl·let d'illots (mínim 100 fins 300) o del primordi pancreàtic de l'edat compresa entre e12.5 fins e16.5 i afegir 600µl de la solució RLT, on hem afegit β-mercaptoetanol (10µL de β-mercaptoetanol per ml de RLT)
- 1.2. Homogeneïtzar el teixit amb una xeringa estèril de 30G (En aquest pas es pot conservar a -80°C o seguir amb el protocol)
- 1.3. Afegir el mateix volum d'etanol 70% i mesclar-ho tot bé amb la pipeta

2. Càrrega a la columna

- 2.1. Afegir un màxim de 750µl de la mescla a la columna i centrifugar 1min a 10.000rpm
- 2.2. Descartar líquid que està al tub recol·lector i repetir el pas 2.1 fins esgotar la mostra

- 2.3. Rentar la columna amb 350µl de la solució RW1, centrifugar 1min a 10.000rpm i descartar el líquid que ha passat a través de la columna
3. Tractament amb DNasa
- 3.1. Afegir 80µl de la solució de DNasa (70µl de la solució RDD més 10µl de la solució de DNasa) directament sobre la membrana de la columna
- 3.2. Incubar a temperatura ambient durant 20min
- 3.3. Descartar el líquid que ha passat a través de la columna
4. Rentats i elució
- 4.1. Afegir 500µl de la solució RPE, centrifugar 1min a 10.000rpm i descartar el líquid que ha passat a través de la columna
- 4.2. Repetir el pas anterior
- 4.3. Centrifugar a 8.000rpm durant 1min
- 4.4. Canviar el tub eppendorf receptor de l'eluent
- 4.5. Afegir de 35-40µl d'aigua lliure de RNases directament sobre la membrana sílica gel i incubar 1min a temperatura ambient
- 4.6. Centrifugar a 10.000rpm durant 1min

3.1.3. MÈTODE DE PURIFICACIÓ PER FENOL/CLOROFORM

L'extracció de RNA pel mètode fenol/cloroform hauria de ser sempre de teixit acabat d'extreure. En cas de no ser possible, es poden tractar les mostres amb RNAlater (Ambion). Aquest mètode és òptim per extreure el RNA de pàncrees embrionari des del dia e17.5 de desenvolupament fins l'adult.

Protocol RNAlater:

1. Submergir la mostra fresca en 5-10 volums (pes/volum) de RNAlater
 2. Deixar la mostra a 4°C durant 12h
 3. Eliminar el RNAlater per decantació i congelar la mostra a -80°C fins el seu ús
- Aquest protocol es basa també en la separació del RNA per bifases orgàniques-aquoses, conjuntament amb processos de precipitació amb alcohols. Es recomana no fer moltes mostres de forma simultània, ja que es compromet la rapidesa dels diferents passos del protocol comproment així l'integritat del RNA.

Protocol per un pàncrees de ratolí (~0,5g de teixit):

1. Extracció per tiocianat de guanidina (guanidine thiocyanate)
- 1.1. Afegir 10ml de solució desnaturalitzant en un falcon de 50ml i refredar en gel (Nalgene® PFCO #3119-0050)
- 1.2. Extreure el pàncrees i introduir-lo al tub
- 1.3. Homogeneïtzar la mostra amb un homogeneïtzador de tipus Ultra turrax, o similar a velocitat mitja per evitar l'escalfament de la mostra
- 1.4. Afegir una desena part del volum inicial d'acetat sòdic 2M
- 1.5. Afegir 10ml de fenol/cloroform:isoamil alcohol (PCI) i agitar vigorosament
- 1.6. Incubar la mostra 15min en gel i centrifugar a 10.000g durant 20min a 4°C
- 1.7. Recollir sobrenedant (fase aquosa) i transferir-lo a un tub nou
2. Repetir extracció per PCI
- 2.1. Afegir a la fase aquosa 10ml PCI, agitar i incubar durant 5min en gel
- 2.2. Centrifugar a 10.000g durant 20min a 4°C
- 2.3. Recollir sobrenedant (fase aquosa) i transferir-lo a un tub nou

3. Precipitar el RNA
- 3.1. Afegir 10ml d'isopropanol i incubar la mostra 20min a -20°C
- 3.2. Centrifugar la mostra a 10.000g durant 20min a 4°C
- 3.3. Descartar el sobrenedant sense desenganxar el pèl-let
4. Repetir extracció per PCI
- 4.1. Re-suspendre el pèl-let en 5ml de solució desnaturalitzant
- 4.2. Afegir 500µL d'acetat sòdic 2M
- 4.3. Afegir 5ml de PCI, agitar i incubar durant 5min en gel
- 4.4. Centrifugar a 10.000g durant 20min a 4°C
- 4.5. Recollir sobrenedant (fase aquosa) i transferir-lo a un tub nou
5. Precipitar el RNA
- 5.1. Repetir apartat 3 partint de 5ml d'isopropanol
6. Extracció per hidroclohidrat de guanidina (guanidine hydrochloride)
- 6.1. Re-suspendre el pèl-let en 10ml solució hidroclohidrat de guanidina
- 6.2. Afegir 10ml de PCI, agitar vigorosament durant 1min
- 6.3. Centrifugar a 10.000g durant 20min a 4°C
- 6.4. Recollir sobrenedant (fase aquosa) i transferir-lo a un tub nou
7. Precipitar el RNA
- 7.1. Afegir 0.5ml d'acetat sòdic 2M
- 7.2. Afegir 10ml d'etanol 100% i incubar 20min a -20°C (En aquest punt del protocol es pot parar per un període de temps raonable)
- 7.3. Centrifugar a 10.000g durant 20min a 4°C
- 7.4. Descartar el sobrenedant sense desenganxar el pèl-let
8. Reprecipitar el RNA
- 8.1. Re-suspendre el pèl-let en 1ml d'hidroclohidrat de guanidina. Distribuir el ml en dos tubs eppendorf (0.5ml + 0.5ml) i afegir a cadascú 50µl d'acetat sòdic 2M
- 8.2. Afegir a cada tub 1ml d'etanol 100% i incubar les mostres 15min a -20°C
- 8.3. Centrifugar a màximes revolucions durant 10min a 4°C
- 8.4. Descartar el sobrenedant
9. Rentar el RNA
- 9.1. Afegir a cada tub 1ml d'etanol 10% i centrifugar a màxima velocitat durant 5min a 4°C
- 9.2. Descartar el sobrenedant
- 9.3. Re-suspendre el pèl-let en 300µl d'aigua lliure de RNases
10. Precipitar el RNA
- 10.1. Afegir a cada tub 60µl d'acetat sòdic 2M i 1ml d'etanol 100%
- 10.2. Incubar les mostres 15min a -80°C
- 10.3. Centrifugar a màxima velocitat durant 10min a 4°C i descartar el sobrenedant
11. Rentar el RNA
- 11.1. Afegir a cada tub 1ml d'etanol 70%
- 11.2. Centrifugar a màxima velocitat durant 5min a 4°C
- 11.3. Descartar el sobrenedant
- 11.4. Deixar assecar a temperatura ambient el pèl-let
- 11.5. Re-suspendre'l en 250µl d'aigua lliure de RNases

Solucions utilitzades:

Solució desnaturalitzant (guardar a 4°C)

#Z5651 Promega. Contingut:

26mM citrat sòdic (pH 4.0)

0.5% N-lauril sarcosina

0.125M β-mercaptoetanol

4M tiocianat de guanidina

Solució d'hidroclohidrat de guanidina (guardar a 4°C)

6M hidroclohidrat de guanidina (Sigma)

0.025M EDTA (àcid etilendiaminotetraacètic) (Sigma)

0.0107M β -mercaptoetanol (Sigma)

Fenol: Cloroform: Isoamil alcohol (PCI), 99:24:1 (guardar a 4°C)

99ml fenol

24ml cloroform

1ml isoamil alcohol

Recobert amb 50ml de 42mM citrat sòdic, pH 4.3-4.7

3.2. QUANTIFICACIÓ DEL RNA I DETERMINACIÓ DE LA SEVA INTEGRITAT

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

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

3.2.1. DETERMINACIÓ DE LA INTEGRITAT DEL RNA PER ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA DESNATURALITZANT

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

Protocol:

- Preparació d'un gel d'agarosa desnaturalitzant (50ml):

1. Afegir a un recipient:

Aigua lliure de RNases	35ml
Agarosa (Sigma).....	0.55g
2. Escalfar en un microones fins que l'agarosa es fongui

3. Afegir:
 - MOPS (tampó d'àcid 3-(N-morfolino)propanosulfònic) 10x (Ambion) 5ml
 - Formaldehid al 30% (Sigma)..... 10ml
 4. Deixar polimeritzar amb una pinta per formar els pouets
 5. Introduir el gel en una cubeta amb tampó MOPS 1x
- Preparació de les mostres:
 1. Traspassar entre 3 i 5µg de RNA en un tub
 2. Afegir 15µl de tampó formaldehid de càrrega (Ambion)
 3. Escalfar la mostra 15min a 65°C (desnaturalització) i refredar en gel
 4. Afegir 1µl de bromur d'etidi (Sigma) i carregar les mostres en el gel i sotmetre'l a una càrrega d'uns 50V

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

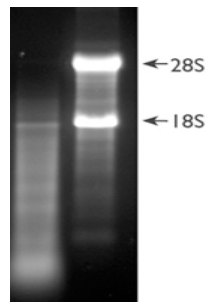


FIGURA 20. Revelat d'un gel on la primera columna és un RNA totalment degradat i el de la segona té una qualitat molt superior.

3.2.2. **DETERMINACIÓ DE LA SEVA INTEGRITAT PER BIOANALYZER**

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

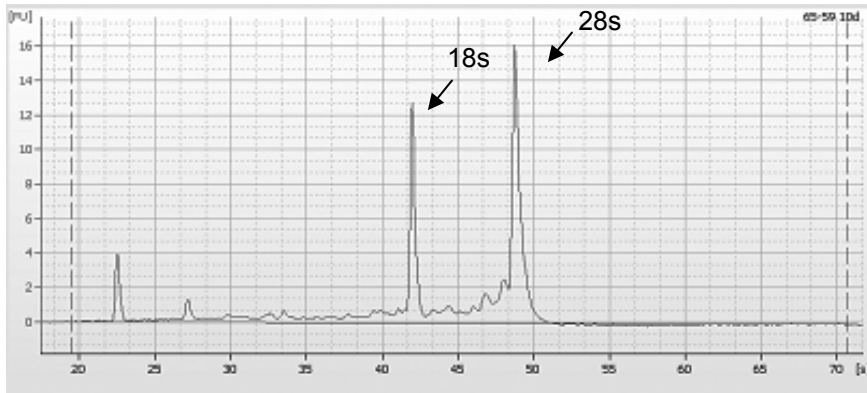


FIGURA 21. Electroforograma d'una mostra d'illots amb gran integritat.

3.3. RETROTRANSCRIPCIÓ DE RNA A cDNA

Principalment es va emprar la retrotranscriptasa d'Invitrogen SuperScript III

3.3.1. ELIMINACIÓ DE DNA

Bàsicament consisteix en el tractament del RNA amb Deoxyribonucleasa I (DNasal). Aquest tractament no serà necessari per als RNA obtinguts per columnes, ja que durant aquest protocol ja reben el tractament.

Protocol:

- Afegir a un tub:

RNA	0.5-2µg
Tampó de reacció de la DNasal	1µl
DNasal (1U/µl)	1µl
Aigua lliure de RNases	fins 10µl
- Deixar 15min a temperatura ambient
- Afegir 1µl d'EDTA 25mM, per quelar els cations Mg^{2+} i Ca^{2+} i que la DNasa quedi inactivada
- Escalfar la mostra a 65°C durant 10min per tal de desnaturalitzar i inactivar definitivament la DNasa

3.3.2. PROTOCOL SUPERSRIPT III

Protocol:

- Afegir a un tub de 0.2 ml:

Random primers	0.5µg
RNA	0.5 a 5µg
Aigua lliure de RNases	fins 10µl
- Escalfar el tub a 70°C durant 10min
- Refredar en gel
- Afegir:

Tampó de primera cadena (first strand buffer) (5x).....	4µl
DTT (ditiotreitòl) 0,1M.....	2µl

- | | |
|---------------------------------|-------|
| Mescla de dNTPs a 10Mm | 1µl |
| RNaseOUT (40U/µl) | 0.5µl |
| SuperScript III (200U/µl) | 1µl |
| Aigua lliure de RNases | 1.5µl |
5. Incubar en un termociclador a:
- 25°C durant 5min
 - 42°C durant 15min (alineament)
 - 50°C durant 60-90min (elongació)
 - 5°C durant 10min
 - 70°C durant 15min (inactivació)
 - 4°C fins la retirada del tub

4. ADENOVIRUS RECOMBINANTS

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

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

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

4.1. GENERACIÓ DE L'ADENOVIRUS Ad.CMV-Wnt9a

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

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

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

3. Afegir a un tub estèril:

Plasmidi pJM17.....	2µg
Plasmidi pCCMV.pLpA-Wnt9a	1.5µg
(Ràtio pJM17: pCCMV.pLpA 1:2 – 1:4)	
Medi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) sense suplementar ...	100µl
Superfect (Qiagen).....	8-16µl
4. Pipetejar per homogeneïtzar la mostra
5. Incubar 10min a temperatura ambient
6. Afegir 1ml de medi de cultiu suplementat
7. Pipetejar per homogeneïtzar la mostra
8. Aspirar el medi de cultiu de la placa
9. Afegir el contingut del tub a cada pouet
10. Incubar tota la nit en l'incubador a 37°C. Afegir 2ml de medi suplementat i deixar-lo fins que sigui necessari el seu canvi (anar monitoritzant)

B. Observació de clapes

11. Passada una setmana, comprovar l'aparició de zones on s'observi lisi cel·lular (clapa).
12. Les clapes apareixen a partir de la segona setmana de la transfecció, i com a màxim a les 4 setmanes.
 - 12.1. Si apareixen clapes, deixar el medi durant 2-3 dies fins que s'observi una lisi completa de tot el pou. Moment en el que aspirarem tot el medi que contindrà l'adenovirus i procedirem a la seva congelació.
 - 12.2. Si no apareixen clapes i el medi s'esgota, és a dir, canvia el pH i comença a groguejar, es posa medi de cultiu nou. Si passades 4 setmanes no ha aparegut cap clapa repetir la transfecció provant altres condicions.

4.2. AMPLIFICACIÓ D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS

Protocol:

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

4.3. AÏLLAMENT DE DNA VÍRIC

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

Protocol:

1. Afegir a un tub:
 - Lisat cru adenoviral..... 250-500µl
 - Solució de lisi 250-500µl
2. Incubar 1 hora a 56°C.
3. Afegir un volum de fenol:cloroform:isoamil alcohol (25:24:1, pH 8.0, EDTA 1mM, Sigma) i agitar per homogeneïtzar
4. Centrifugar a $\geq 10.000g$ durant 3-5min
5. Transferir la fase aquosa (sobrenedant) a un nou tub
6. Precipitar el DNA afegint 0.1 vol d'acetat sòdic 3M, pH 5.2 i 2 volums d'etanol absolut
7. Incubar a -20°C durant mínim 1h
8. Centrifugar a màxima velocitat durant 20min a 4°C
9. Eliminar el sobrenedant i rentar el pèl·let amb 1ml d'etanol 70%
10. Centrifugar a màxima velocitat durant 5min a 4°C
11. Eliminar el sobrenedant i deixar assecar a temperatura ambient
12. Re-suspèndre el pèl·let amb solució TE (volum variable en funció de la mida del pèl·let 100-300µl)

Solucions utilitzades:Solució de lisi

Proteïnasa K a 20mg/ml (Invitrogen)	25µl
Solució EDTA 0.5M, pH 8.0 (Sigma)	80µl
SDS (dodecilsulfat sòdic) (10%) (Serva)	10µl
H ₂ O.....	fins 1ml

4.4. TITULACIÓ D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS

Existeixen diferents assajos per conèixer la concentració de partícules víriques obtingudes durant el procés d'amplificació. L'utilitzat en aquesta tesi és el TCID₅₀ (50% *Tissue Culture Infective Dose*) que quantifica la quantitat de virus requerida per lisar el 50% de les cèl·lules hoste (HEK293). S'han de realitzar una bateria de dilucions adenovíriques i observar quina és la màxima dilució capaç de lisar les cèl·lules. El percentatge de mort cel·lular (cèl·lules infectades) es observat manualment i els resultats obtinguts són emprats per calcular matemàticament el TCID₅₀.

Protocol (realitzat per duplicat per cada virus):

1. Tripsinitzar un flascó de 75cm² de HEK293, comptar les cèl·lules i preparar una dilució de $3 \cdot 10^5$ cèl·lules/ml en medi de cultiu
2. Sembrar 100µl per pouet ($2 \cdot 10^4$ cèl·lules) en una placa de 96 pous
3. Incubar a 37°C unes 24h
4. Preparar la bateria de dilucions :
 - 4.1. Dilució 10^{-2} : Afegir a un tub 495µl de medi de cultiu de HEK293 més 5µl de la solució d'adenovirus que volem titular. Homogeneïtzar pipetejant
 - 4.2. Dilució 10^{-4} : Afegir a un tub 495µl de medi de cultiu de HEK293 més 5µl de la dilució 10^{-2} . Homogeneïtzar pipetejant
 - 4.3. Dilució 10^{-6} : Afegir a un tub 495µl de medi de cultiu de HEK293 més 5µl de la dilució 10^{-4} . Homogeneïtzar pipetejant

- 4.4. Dilució 10^{-7} : Afegir a un tub de 5ml (BectonDickinson) 1.8ml de medi més 200µl de la dilució 10^{-6} . Homogeneïtzar pipetejant
5. Repetir el pas 4.4 fins la dilució 10^{-14}
6. Afegir a cada fila de la placa de 96 pous 100µl d'una de les dilucions, partint de la dilució 10^{-7} i acabant en la dilució 10^{-14} , deixant les columnes 11 i 12 lliures (controls negatius) on afegirem 100µl de medi sense adenovirus
7. Deixar la placa a l'incubador durant 10 dies
8. Observar cada pouet i anotar en aquells pouets on hi ha lisi cel·lular (presència de clapes)

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

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

$$B = \sum A_i$$

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

**Controls
negatius**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10^{-7}												
10^{-8}												
10^{-9}												
10^{-10}												
10^{-11}												
10^{-12}												
10^{-13}												
10^{-14}												

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

4.5. INFECCIÓ AMB ADENOVIRUS RECOMBINANTS

A l'hora d'infectar s'ha de tenir en compte la multiplicitat d'infecció (MOI, multiplicity of infection). La MOI és la relació entre partícules infeccioses i el nombre de cèl·lules que s'han d'infectar.

La MOI es determina de manera molt senzilla, dividint el nombre de partícules víriques que s'afegixen (ml medi x PFU/ml) pel nombre de cèl·lules (ml medi x cèl·lules/ml).

Protocol:

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

5. PROTEÏNES

5.1. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES

5.1.1. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES DE CULTIUS CEL·LULARS

Protocol:

1. Aspirar el medi de cultiu
2. Rentar amb DPBS i posar la placa en gel per preservar la integritat de les proteïnes
3. Aspirar el DPBS i afegir una quantitat suficient de tampó de lisi per a cobrir el pou
4. Llisar les cèl·lules amb l'ajuda d'un raspador (scraper) i traspasar el lisat cel·lular a un eppendorf. Mantenir el lisat en gel durant uns minuts (aproximadament 20min)
5. Per ajudar a lissar bé les cèl·lules, podem utilitzar una xeringa d'insulina (0.5ml) que conté agulla de diàmetre 30G
6. Centrifugar la mostra a màximes revolucions 15-20min a 4°C per baixar totes les restes cel·lulars
7. Recollir el sobrenedant i passar-lo a un tub net

Solucions utilitzades:

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

Tris pH 8.0.....	50mM
NaCl 1M	150mM
SDS 10%	100µl
NP-40 (IGEPAL)	100µl
Deoxicolat sòdic.....	50mg
H ₂ O	fins a 10ml

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

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

Tampó CoIP (Co-immunoprecipitation), per a preparar 50ml de tampó a 2X

NaCl	200mM
Tris-HCl, pH 7.5	20mM
EDTA	1mM
NP-40 (IGEPAL)	1ml
NaF.....	5mM
H ₂ O	fins a 50ml

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

Tampó CoIP 2X.....	500µl
Còctel inhibidor de proteases 10X (Sigma).....	100µl
H ₂ O	400µl

5.2. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

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

Protocol:

1. Preparem una corba estàndard de BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma) a partir d'una dilució estoc a 2mg/ml. Preparem les diferents concentracions diluint en H₂O: 1.5mg/ml; 1.0mg/ml; 0.75mg/ml; 0.5mg/ml; 0.25mg/ml; i 0mg/ml
2. Ho afegim per aquest ordre i en duplicat 5µl de cada mostra en una placa transparent de 96 pous
3. Afegim 5µl de la mostra a quantificar, també per duplicat
4. Afegim 25µl de la solució A' (barreja de les solucions A i S, per a 1ml posem 980µl de la solució A i 20µl de la solució S, tal i com indica el protocol), tant a la corba com a les mostres
5. Afegim 200µl de la solució B, tant a la corba com a les mostres
6. Barregem i deixem incubar uns 15 minuts en la foscor a temperatura ambient

5.3. DETECCIÓ DE PROTEÏNES

5.3.1 ELECTROFORESI DE PROTEÏNES (SDS-PAGE)

Per separar les proteïnes en funció del seu pes molecular es va utilitzar la tècnica anomenada SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis). Utilitzem el MiniProtean Kit de Bio-Rad.

Protocol:

1. Netejar els vidres amb aigua i etanol, els assequem bé
2. Fer el muntatge dels vidres sobre els suports, i mirar que estiguin ben segellats i no perdin líquid
3. Afegir la fase separadora (resolving solution) fins el volum que després ens permeti afegir les pintes
4. Afegir butanol (Carlo Erba) saturat en aigua (1:1) per eliminar les bombolles que hagin pogut quedar a la part superior del gel i alinear-la
5. Deixar polimeritzar
6. Eliminar el butanol per decantació, rentar amb aigua i assecar les restes amb un paper 3MM (Whatman®)
7. Afegir la fase concentradora (stacking solution) i col·locar la pinta que forma els pous abans que polimeritzi el gel
8. Deixar polimeritzar
9. Col·locar els vidres amb el gel en el suport corresponent per posar-ho dins la cubeta de la MiniProtean
10. Afegir el tampó d'electroforesi 1X entremig dels vidres per mirar que no perdi líquid, i un cop s'observa que està tot segellat reomplir la cubeta amb més tampó d'electroforesi 1X
11. Treure les pintes amb cura i rentar els pous
12. Preparar les mostres:
 - 12.1. Preparar el volum corresponent a la quantitat de mostra desitjada, generalment 50µg de proteïna
 - 12.2. Afegir-hi el tampó de càrrega Laemmli 2X en una proporció 1:1
 - 12.3. Desnaturalitzar les mostres a 95°C durant 5min en un bany sec

13. Carregar el marcador de pes molecular (Full-range Rainbow molecular weight marker, GE Healthcare) i les mostres desnaturalitzades
14. Tancar la cubeta MiniProtean i córrer el gel a un voltatge constant (entre 100 i 120V) durant 1-2 hores, fins que el front de les mostres s'escapi del gel

Solucions utilitzades:

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

H ₂ O.....	3.3ml
Acrilamida/Bis-acrilamida al 29/1% (Bio-Rad).....	4ml
Tris 1.5M pH 8.8.....	2.52ml
SDS (sodium dodecyl sulfate) 10%.....	0.1ml
Persulfat d'amoni 10% (APS) (Sigma).....	0.08ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilendiamina).....	0.0032ml

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

H ₂ O.....	3.43ml
Acrilamida/Bis-acrilamida al 29/1% (Bio-Rad).....	0.83ml
Tris 1.0M pH 6.8.....	0.63ml
SDS (sodium dodecyl sulfate) 10%.....	0.05ml
Persulfat d'amoni 10% (APS) (Sigma).....	0.05ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilendiamina).....	0.005ml

Tampó d'electroforesi 10X (running buffer)

Tris (hidroximetil) aminometà.....	30g (250mM)
Glicina.....	144g (1.92M)
H ₂ O.....	fins a 1L

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

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

Tampó de càrrega (Laemmli 2X)

Tris (hidroximetil) aminometà 1M pH 6.8.....	1ml
Glicerol.....	2ml
SDS 10%.....	4ml
H ₂ O.....	2ml
Blau de bromofenol.....	unes gotes

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

5.3.2 **TRANSFERÈNCIA HUMIDA DE PROTEÏNES**

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

Protocol:

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

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

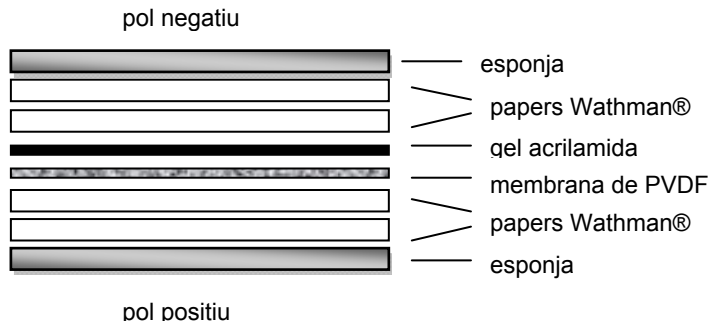


FIGURA 23. Esquema de muntatge d'un casset de transferència

Solucions utilitzades:

Tampó de transferència

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

TBS 20X (Tris Buffered Saline)

Tris (hidroximetil) aminometà	48g (400mM)
NaCl	175.4g (3M)
H ₂ O	fins a 800ml

Ajustar el pH a 7.4 amb HCl 10N i enrasar fins a 1L d'H₂O

TBS-T (Tris Buffered Saline- Tween20)

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

5.3.3 BLOQUEIG DE LA MEMBRANA DE PVDF

La membrana de PVDF conté totes les proteïnes de l'extracte proteic, per tant, necessitem bloquejar la membrana per evitar les unions inespecífiques de l'anticòs a la membrana. Hi ha diferents solucions de bloqueig, però habitualment s'utilitza la llet en pols descremada (NFDM, non-fat dried milk) o BSA (Bovine Serum Albumin).

Protocol:

1. Un cop tenim la membrana en TBS-T després de la transferència, submergim la membrana en la solució de bloqueig, que en el nostre cas majoritàriament es tracta del 5% de llet en pols descremada en TBS-T

2. Incubar en solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació
3. Rentar la membrana submergint-la en TBS-T durant 3-5min a temperatura ambient i en agitació
4. Descartar el TBS-T i repetir el procés fins a 2 vegades més

5.3.4 **IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES**

Un cop hem bloquejat la membrana, hem d'incubar-la amb un anticòs que ens detectarà la proteïna en la qual estem interessats, i seguidament afegim un segon anticòs que ens detectarà el primer i que va unit a la peroxidasa de rave picant (HRP, *Horseradish peroxidase*), que ens permetrà la seva detecció gràcies al reactiu ECL (*enhanced chemiluminescence*), que en presència de la peroxidasa emet llum que detectarem utilitzant un film fotogràfic o gràcies a l'aparell ImageQuant LAS4000.

Protocol:

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

5.3.5 **ELIMINACIÓ DELS ANTICOSSOS (STRIPPING)**

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

Protocol:

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

Solucions utilitzades

Solució de stripping

Tris (hidroximetil) aminometà 0.5M pH 6.8.....62.5ml
 SDS 10%.....100ml

β -mercaptoetanol (Sigma).....	3.5ml
H ₂ O.....	fins a 0.5L

5.3.6 **IMMUNOPRECIPITACIÓ (IP)**

Els protocols d'immunoprecipitació es fonamenten en la formació del complex antígen-anticòs específic i en la capacitat de fer precipitar aquests complexos.

Protocol

1. Recollir els lisats cel·lulars amb 1ml de tampó CoIP 1x per a una placa de 10cm². Deixar 10min en gel i acabar de trencar les cèl·lules emprant un cicle de sonicació. Centrifugar a màxima velocitat durant 15min i quantificar
2. Barrejar: 0.5-1mg d'extracte proteic
Tampó CoIP 1x fins a 500 o 1000 μ l
2-5 μ g d'anticòs contra la nostra proteïna d'interès (és necessari fer un tub amb anticòs control, una IgG de l'espècie de l'anticòs d'estudi)
3. Incubar en rotació durant tota la nit a 4°C (aproximadament 16h)
4. Afegir 30 μ l de proteïna G Dynabeads (Invitrogen) prèviament rentat amb PBS 1x
5. Incubar en rotació durant 25min a temperatura ambient
6. Emprar un sistema de magneto per agrupar les Dynabeads i poder eliminar el sobrenedant
7. Fer 2 rentats amb tampó CoIP 1x i un rentat final amb PBS 1x
8. Re-suspendre el pèl·let amb 30 μ l de tampó de càrrega d'electroforesi (SDS-PAGE) 2x i incubar 10min a 90°C
9. Recollir el sobrenedant evitant agafar Dynabeads. Tenim la solució preparada per ser carregada en un gel d'acrilamida per separar les mostres electroforèticament i continuar com en l'apartat 5.3

Solucions utilitzades:

Tampó de coimmunoprecipitació 1x (CoIP 1x)

NaCl 100mM
Tris pH 7.5 20mM
EDTA 1mM
NP-40 (IGEPAL) 1%
NaF 5mM
Còctel inhibidor de proteases 1x

5.3.7 **IMMUNOHISTOQUÍMICA**

Per detectar la presència de les hormones pancreàtiques, de diferents marcadors de desenvolupament pancreàtic i de Wnt9a vam utilitzar tècniques de detecció per immunohistoquímica.

5.3.7.1 *Fixació dels teixits*

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

Protocol:

1. Extreure el pàncrees amb certa rapidesa i submergir-lo en solució de rentat DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma) i mantenir en gel fins que s'hagin extret els pàncrees de tots els animals
2. Submergir els teixits en solució de paraformaldehid al 4% en DPBS (provinent d'una solució estoc al 16% PFA, Sigma) i deixar un mínim de 4h a 4°C en agitació perquè la solució penetri bé al teixit
3. Treure el PFA 4% i rentar el teixit amb DPBS durant 5min
4. Treure el DPBS i afegir-ne de nou i rentar durant 5min
5. Repetir el quart pas una vegada més, treure el DPBS i afegir-ne de nou per rentar durant 20-30min en agitació i a 4°C
6. Preparar una bateria d'etanols a partir d'etanol absolut (Panreac), passant per etanol 50%, etanol 70% i etanol 95%
7. Eliminar el DPBS, afegir etanol al 50% i incubar 30min a temperatura ambient
8. Eliminar l'etanol al 50%, afegir-ne de nou i incubar 30min a temperatura ambient
9. Eliminar l'etanol al 50%, afegir etanol al 70% i incubar 30min a temperatura ambient
10. Eliminar l'etanol al 70%, afegir-ne de nou i incubar 30min a temperatura ambient. Aquí podem parar la deshidratació del teixit deixant-lo a 4°C o podem seguir endavant amb el pas següent
11. Eliminar l'etanol al 70%, afegir etanol al 95% i incubar 30min a temperatura ambient
12. Eliminar l'etanol al 95%, afegir-ne de nou i incubar 30min a temperatura ambient
13. Eliminar l'etanol al 95%, afegir etanol al 100% i incubar 30min a temperatura ambient
14. Eliminar l'etanol al 100%, afegir-ne de nou i incubar 30min a temperatura ambient
15. Eliminar l'etanol al 100%, afegir xilol (Panreac) i incubar 1h a temperatura ambient
16. Eliminar el xilol, afegir-ne de nou i incubar 1h a temperatura ambient
17. Eliminar el xilol, submergir el teixit en parafina (Paraffin Diawax 56-58°C, DiaPath) líquida a 50°C i incubar 1h a 50°C
18. Eliminar la parafina, submergir el teixit en parafina nova líquida a 50°C i incubar 1h a 50°C
19. Muntar els blocs de parafina utilitzant motlles metàl·lics i cassets d'inclusió amb l'estació de parafina (Leica)
20. Deixar refredar la mostra per a que solidifiqui la parafina

5.3.7.2 Muntatge dels talls de parafina en portaobjectes**Protocol:**

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

5.3.7.3 Muntatge dels talls de parafina en portaobjectes per als estudis de morfometria de pàncrees**Protocol:**

1. Realitzar talls del teixit amb un gruix de 3µm utilitzant un micròtom (Leica RM 2135). Els talls es realitzaran en tires seguides
2. Posar els talls en un bany d'aigua calenta a 40°C (Leica HistoBath HI1210) i tallar conjunts de tires amb tres talls cada un
3. Col·locar de manera ordenada 3 talls seguits en cada porta tractat amb poli-L-lisina formant una primera columna de talls
4. Els 3 talls següents es col·loquen en un segon porta i així fins a 6 portes (en el cas d'aparell digestiu a e18.5) i 4 portes (en el cas d'aparell digestiu e15.5)

5. Un cop tenim la primera columna de talls procedim a generar una segona columna i així fins a 5 columnes en cada porta
6. Quan s'acaba amb el primer conjunt de 5 portes (en el cas d'aparell digestiu a e18.5) o 4 portes (en el cas d'aparell digestiu a e18.5) repetim els passos del 3 al 5 fins que s'esgoti el teixit (veure esquema de la figura 24)
7. Deixar assecar les mostres en una estufa a 37°C durant unes hores o a temperatura ambient tota la nit

5.3.7.4 Immunofluorescència

5.3.7.4.1 Desparafinització i rehidratació de la mostra:

Protocol:

1. Submergir les mostres en xilol 5min
2. Submergir les mostres en una solució de xilol nova 5min
3. Submergir les mostres en etanol 100% 5min
4. Submergir les mostres en etanol 95% 5min
5. Submergir les mostres en etanol 70% 5min
6. Submergir les mostres en etanol 50% 5min
7. Submergir les mostres en H₂O 5min
8. Submergir les mostres en PBS fins el proper pas

5.3.7.4.2 Exposició antigènica (antigen retrieval):

Protocol:

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

5.3.7.4.3 Permeabilització:

Protocol:

1. Submergir les mostres en solució de permeabilització Tritó X-100 al 0.5% en PBS, i deixar 20min a temperatura ambient
2. Submergir les mostres en PBS 1X durant 5min
3. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.4.4 Bloqueig de les unions inespecífiques:

Protocol:

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

5. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.4.5 Incubació amb l'anticòs primari

Protocol:

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

5.3.7.4.6 Incubació amb l'anticòs secundari

Protocol:

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

5.3.7.4.7 Muntatge

Protocol:

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

Solucions utilitzades:

Solució de citrat trisòdic 10nM, pH 6.0

Citrat trisòdic (Fluka) 1.47g

H₂O..... 500ml

PBS-Tritó X-100 0.5%

Tritó X-100 (Sigma-Aldrich)..... 0.5ml

H₂O..... 99.5ml

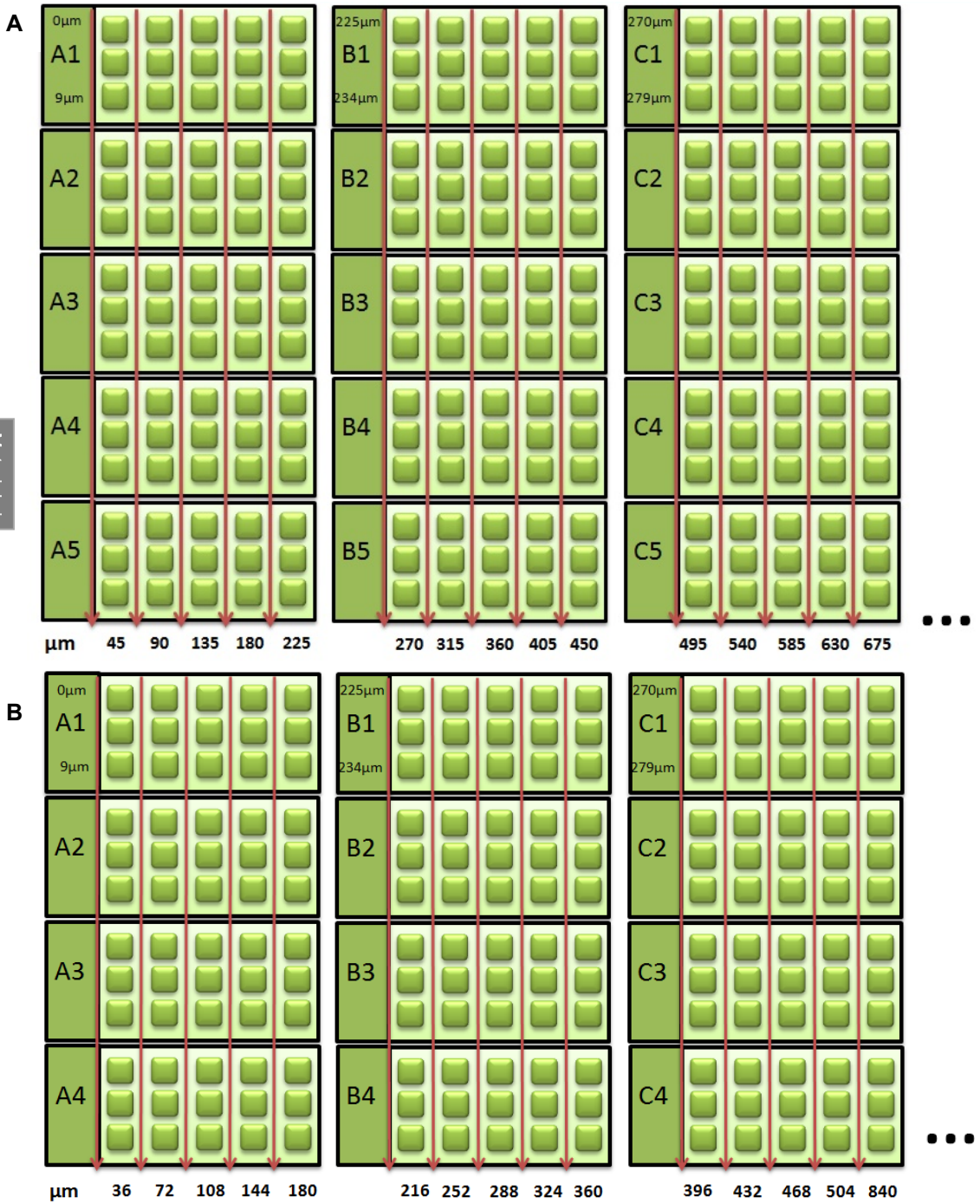


FIGURA 24. Esquema de muntatge de les morfometries. (A) e18.5 i (B) e14.5

Mowiol

1. Afegir en un vas de precipitats
 - Mowiol 4-88 (Calbiochem) 7.2g
 - Glicerol (Carlo Erba) 14.3ml
2. Barrejar amb un agitador magnètic durant 1 h a temperatura ambient
3. Afegir 18ml d'H₂O
4. Barrejar amb un agitador magnètic durant 2 h a temperatura ambient
5. Afegir 36ml de 0.2M Tris(hidroximetil)aminometà pH 8.5
6. Barrejar amb un agitador magnètic durant 2h a 50°C
7. Centrifugar a 5000g durant 15min
8. Aliquotar i congelar a -20°C

Portaobjectes tractats amb poli-L-lisina

Preparar poli-L-lisina al 0.01%:

- Poli-L-lisina al 0.1% (Sigma) 30ml
- H₂O 270ml

Protocol:

1. Submergir els portaobjectes de vidre nets en una cubeta amb la solució de poli-L-lisina 0.01%, deixar 5min a temperatura ambient
2. Treure els portaobjectes de la cubeta i deixar-los assecar a temperatura ambient tota la nit

5.3.7.5 Immuno-peroxidasa**5.3.7.5.1 Desparafinització i rehidratació de la mostra:**Protocol:

1. Submergir les mostres en xilol 5min
2. Submergir les mostres en una solució de xilol nova 5min
3. Submergir les mostres en etanol 100% 5min
4. Submergir les mostres en etanol 95% 5min
5. Submergir les mostres en etanol 70% 5min
6. Submergir les mostres en etanol 50% 5min
7. Submergir les mostres en H₂O 5min
8. Submergir les mostres en PBS fins el proper pas

5.3.7.5.2 Exposició antigènica (antigen retrieval):Protocol:

Aquest pas és opcional, depenent del tipus d'anticòs que utilitzem l'haurem de fer o no. En el cas de les hormones pancreàtiques ens el saltarem, en la resta de marcadors utilitzats en aquesta tesi, l'haurem de fer.

1. Escalfar aigua en una olla a pressió utilitzant una placa calenta a 120°C. Col·locar dins l'olla una cubeta resistent a l'escalfor, on després hi submergirem les nostres mostres, i l'emplenem amb solució citrat
2. Tancar correctament l'olla i esperar que arribi al punt d'ebullició
3. Quan comenci a bullir l'aigua, obrir amb compte l'olla, submergir les mostres en la solució de citrat i tornar a tancar correctament l'olla
4. Deixar escalfar 10min a 120°C amb l'aigua bullent
5. Passats els 10min, treure l'olla de la placa calenta i deixar refredar. Obrir l'olla i deixar temperar les mostres durant aproximadament 30min
6. Submergir les mostres en PBS 1X (Phosphate Buffered Saline, Roche) durant 5min
7. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.5.3 Permeabilització:

Protocol:

1. Submergir les mostres en solució de permeabilització Tritó X 100 al 0.5% en PBS, i deixar 20min a temperatura ambient
2. Submergir les mostres en PBS 1X durant 5min
3. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.5.4 Bloqueig de la peroxidasa endògena

Protocol:

1. Submergir les mostres en peròxid d'hidrogen (H_2O_2 , CUVE[®]) al 3%
2. Deixar 3min a temperatura ambient
3. Submergir les mostres en PBS 1X durant 5min
4. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.5.5 Bloqueig de les unions inespecífiques:

Protocol:

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

5.3.7.5.6 Incubació amb l'anticòs primari

Protocol:

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

5.3.7.5.7 Incubació amb l'anticòs secundari

Protocol:

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

5.3.7.5.8 Revelat peroxidasa

Protocol:

Utilitzem el kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System (Dako)

1. Barregem una gota ($\pm 20\mu\text{l}$) del cromogen DAB amb 1mL de la solució substrat
2. Cobrir la mostra amb la solució preparada i deixar incubar entre 5 i 30min a temperatura ambient
3. Important anar monitoritzant sota un microscopi de llum visible fins que pugi el color
4. Quan es cregui oportú, aturar la reacció netejant la mostra de manera generosa amb aigua

5.3.7.5.9 Contrast amb blau de toluidina

Protocol:

1. Cobrir la mostra amb la solució de tinció durant pocs segons (2-3seg)
2. Rentar els portaobjectes de manera abundant amb aigua
3. Deixar les mostres submergides en PBS

5.3.7.5.10 Muntatge

Protocol:

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

5.3.7.6 Immunocitoquímica

5.3.7.6.1 Preparació de les cèl·lules

Protocol:

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

5.3.7.6.2 Fixació

Protocol:

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

5.3.7.6.3 Permeabilització

Protocol:

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

5.3.7.6.4 Bloqueig d'unions inespecífiques

Protocol:

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

4. Submergir les mostres en PBS 1X durant 5min
5. Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5min

5.3.7.6.5 Incubació amb l'anticòs primari

Protocol:

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

5.3.7.6.6 Incubació amb l'anticòs secundari

Protocol:

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

5.3.7.6.7 Muntatge

Protocol:

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

6. MICROSCOPIA I MUNTATGE D'IMATGES DE MORFOMETRIA

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

Captarem la imatge d'un dels tres talls de cada profunditat (veure figura 25) per a cada animal, per tant tindrem cinc talls analitzats per a cada animal.

Per a això seleccionem l'àrea d'interès en el microscopi i captem les imatges. El *software* ens dóna com a resultat imatges independents que nosaltres ordenarem amb l'ajut del programa d'anàlisi d'imatges MacBiophotonics ImageJ i generarem una

imatge única (Image → Stack → Images to Stack → Make montage). Un cop tenim la imatge generada per un animal i per un dels marcadors, fem el mateix amb els altres marcadors de la mateixa àrea.

Un cop tinguem el muntatge de tots els marcadors per a cada tall tal i com s'observa en la figura 25, fusionarem les imatges per a tenir en una mateixa imatge tots els marcadors a analitzar (Image → Color → Merge channels).

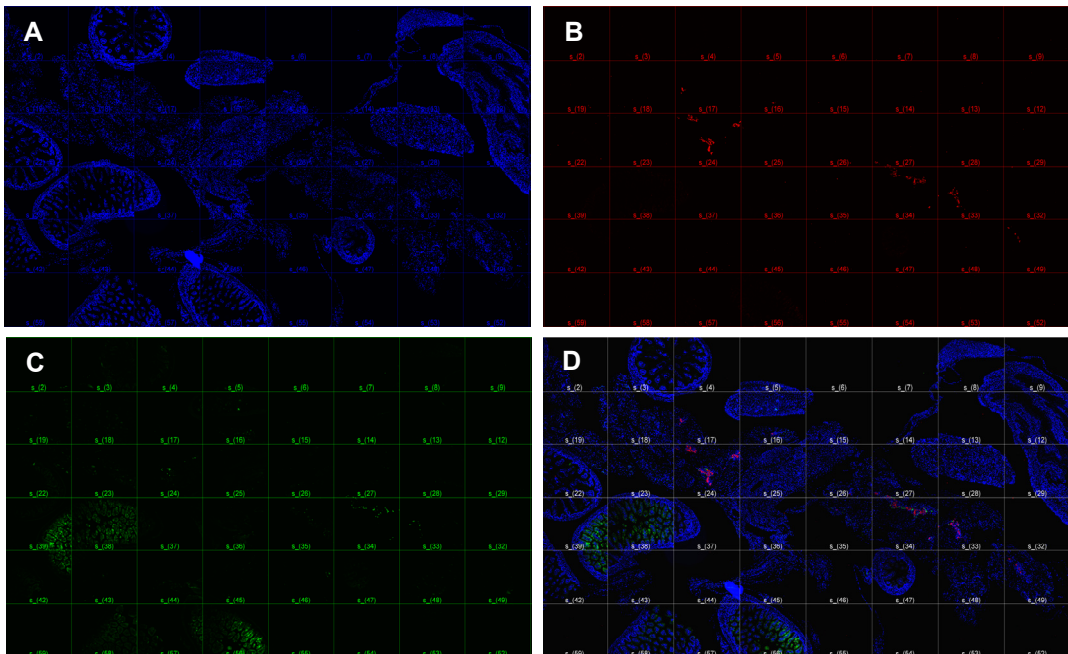


FIGURA 25. Esquema del muntatge d'imatges per a la morfometria. (A) tinció de nuclis, (B) tinció per a insulina, (C) tinció per a glucagó i (D) superposició dels tres muntatges

7. MODELS ANIMALS

7.1. GENOTIPATGE

7.1.1. EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC

Amb l'objectiu de poder genotipar els animals agafem un tros de teixit del qual n'extraurem el DNA amb l'ajut d'una resina quelant (Chelex® 100 Resin, Bio-Rad)

En el cas dels animals adults tallarem un trosset de cua d'aproximadament 1-2cm de llargada, i pel que fa als embrions agafarem tota la cua.

Protocol:

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

Solucions utilitzades:

Solució de digestió:

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

7.1.2. AMPLIFICACIÓ DE DNA (PCR CONVENCIONAL)

Per a amplificar el gen del lligand Wnt9a utilitzem tres encebadors a concentracions diferents i la barreja 1X ReddyMix™ PCR Master Mix (Thermo Scientific).

Protocol:

1. Afegir a un tub de 0.2 ml:

1X ReddyMix™ PCR Master Mix (Thermo Scientific)	10µl
Encebador 5' (Wnt9a-ex2 forward)(10µM).....	0.3µl (200nM)
Encebador 3' (Wnt9a-ex2 reverse)(10µM).....	0.4µl (300nM)
Encebador 5' (neo12)(10µM)	0.8µl (600nM)
DNA.....	2 µl*

 *volums variables
2. Mesclar i centrifugar breument per baixar el contingut
3. Introdur en el termociclador aquestes condicions:

95°C-----	5min
35 cicles de:	
93°C-----	45s (fase de desnaturalització)
58-----	45s (fase d'anellament)
72°C-----	45s (fase d'extensió)
72°C-----	5min
4°C-----	∞

7.2. DETERMINACIÓ DE GLICÈMIA I INSULINÈMIA D'ANIMALS EN ESTADI POST-NATAL 1 (P1)

Protocol:

1. Recollim els animals a les poques hores de néixer
2. Els sacrificuem per decapitació i recollim una gota de sang per a mesurar la glicèmia amb el glucòmetre (Accu-Check, Roche)
3. La resta de sang la recollim per capil·laritat amb un microvette (tub capil·lar amb EDTA) (Sarstedt)
4. Centrifuguem les mostres a 3500rpm durant 20min a 4°C per separar eritròcits, leucòcits i plaquetes
5. Agafem el plasma i el guardem en un nou tub a -80°C fins a la seva utilització
6. Mesurem les insulinèmies utilitzant la tècnica (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Mouse Insulin ELISA Mercodia)

7.2.1. **DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ D'INSULINA (ELISA)**

Per valorar la quantitat d'insulina present en el plasma dels animals a l'estadi post-natal 1 (P1) o el contingut total d'insulina del pàncrees d'animals P1 hem utilitzat l'assaig per immunoabsorció lligat a enzims (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Mouse Insulin ELISA Mercodia).

Protocol:

1. Pipetegem 10µl de cada calibrador o recta estàndard (0; 0.2; 0.5; 1.5; 3.0; 6.5) en una placa de 96 pous
2. Pipetegem 10µl directe de la mostra en el cas del plasma dels animals P1 i 10µl d'una dilució 1/200 de la mostra inicial del contingut total d'insulina
3. Afegir 100µl de l'enzim conjugat a tots els pous
4. Tapar la placa amb un parafilm i incubar durant 2h a temperatura ambient i en agitació suau (700-900rpm)
5. Afegir 700µl de solució de rentat a cada pouet i descartar la solució de la placa per inversió
6. Repetir el cinquè pas 5 vegades
7. En l'últim rentat, colpejar la placa contra un paper assecant per ajudar a eliminar tot l'excés de líquid
8. Afegir 200µl de substrat TMB (tetrametilbenzidina) a cada pou i tapar la placa de la llum amb paper de plata
9. Incubar la placa 15min a temperatura ambient
10. Afegir 50µl de solució de parada a cada pou (aquesta solució conté àcid sulfúric, fent que canviï el pH i el color blau de la solució cap a color groc)
11. Agitar la placa suaument durant 5s a temperatura ambient per barrejar bé
12. Llegir la placa en un espectrofotòmetre per colorimetria (Synergy HT, BioTek) a una absorbància de 450nm

7.3. **DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT TOTAL D'INSULINA EN PÀNCREES D'ANIMALS EN ESTADI POST-NATAL 1 (P1)**

Protocol:

1. Recollim els animals a les poques hores de néixer
2. Els pesem i els sacrificuem per decapitació
3. Fem extracció del pàncrees, ràpidament el pesem i el col·loquem en 1mL de solució àcid-alcohol
4. Homogeneïtzem el teixit amb l'ajut de l'homogeneïtzador del tipus Ultra turrax (per exemple, IKA-WERKE®, Ultra turrax T8-10) o similar a una velocitat mitja per evitar el reescalfament del tub
5. Guardem el teixit homogeneïtzat a 4°C durant tota la nit
6. L'endemà centrifuguem a 3000rpm durant 15min a 4°C, recollim el sobrenedant i el guardem en un nou tub a -20°C fins a la seva utilització
7. Mesurem el contingut d'insulina utilitzant la tècnica (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Mouse Insulin ELISA Mercodia) explicada a l'apartat anterior

7.4. TEST INTRAPERITONEAL DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA (IPGTT)

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

Protocol:

1. Dejunar els animals 6h abans de començar l'assaig
2. Injectar glucosa, via intraperitoneal, en forma de glucosa al 40% (sèrum glucosat hipertònic al 40%, Fresenius Kabi) a una dosi equivalent a 2g de glucosa/ Kg de pes de l'animal
3. Fer un petit tall a la punta de la cua de l'animal (aproximadament d'1mm de longitud) i fer un massatge a la cua per ajudar a que surti la sang
4. Mesurar la glicèmia en sang amb el glucòmetre (Accu-Check, Roche) a diferents temps. Els temps de mesura són a 0, 15, 30, 60 i 120 min després de la injecció de glucosa

7.5. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT B-GALACTOSIDASA EN TEIXIT

El gen LacZ de *Escherichia coli* que codifica per la proteïna β -galactosidasa (β -gal) és el clàssic gen reporter utilitzat en immunohistoquímica. Hi ha diferents substrats per a la detecció de l'activitat β -galactosidasa, però el més utilitzat és el cromogen 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) (Holt et al., 1958). Quan la β -gal trenca l'enllaç glicosídic del x-gal, es produeix un monòmer indoxyl soluble i incolor. Seguidament, dues de les fraccions indoxyl alliberades formen un dímer que no es pot oxidar enzimàticament. El component resultant és molt estable, soluble i de color blau.

El model animal amb el qual treballarem (Wnt9a-LacZ) té l'exó 2 del gen de Wnt9a substituït per un cassette neomicina-LacZ. Això ens permetrà detectar coloració blava allà on s'hauria d'expressar el gen de Wnt9a.

Protocol:

1. Després de la dissecció mantenim el teixit submergit en DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (Sigma-Aldrich)
2. Un cop tenim tots els teixits, els submergim en solució de fixació que conté 0.2% glutaraldehid (Fluka) durant 15min en agitació i a temperatura ambient
3. Rentar el teixit amb la solució de rentat durant 5min en agitació a temperatura ambient
4. Repetir el pas anterior
5. Rentar el teixit amb la solució de rentat durant uns 30min a 4°C en agitació (és important eliminar totes les restes de solució de fixació, perquè pot interferir en la reacció enzimàtica)

6. Submergir el teixit en la solució de tinció i deixar de 24 a 48h a temperatura ambient
7. Un cop s'observi l'aparició de color suficient, treure la solució de tinció i fer rentats amb la solució de rentat
8. Mirar el teixit sota la lupa

Solucions utilitzades:

Solució de fixació

Solució de glutaraldehid 25%	80µl
MgCl ₂ 1M	20µl
DPBS (sense Mg, Ca)(Sigma-Alrich)	fins a 10ml

Solució de rentat

MgCl ₂ 1M	20µl
Solució de detergent estoc	100µl
DPBS (sense Mg, Ca)(Sigma-Alrich)	fins a 10ml

Solució de tinció: preparar en el moment de la seva utilització

Potassi ferrocyanide 50mM	1ml
Potassi Ferricyanide 50mM	1ml
MgCl ₂ 1M	20µl
Solució de detergent estoc	100µl
X-gal 50mg/ml	200µl
DPBS (sense Mg, Ca)(Sigma-Alrich)	fins a 10ml

Solució de detergent estoc: guardar a temperatura ambient

Deoxycolat sòdic	100mg
NP-40 (IGEPAL)	200µl
DPBS (sense Mg, Ca)(Sigma-Alrich)	fins a 100ml

7.6. AÏLLAMENT D'ILLOTS DE RATOLÍ ADULT

Els illots de ratolí adult de 8 setmanes d'edat, s'han isolat amb l'objectiu de fer una posterior extracció de RNA per columna, tal i com està explicat a l'apartat 3.1.2., i poder mesurar canvis en el perfil d'expressió de diferents gens.

Protocol:

1. Preparar un assecador en el fons del qual es col·loca un paper impregnat amb isofluorà (Abbot)
2. Introduir el ratolí en el compartiment superior de l'assecador fins que perdi el coneixement
3. Comprovar que l'animal està correctament anestesiats i procedir al desnucament d'aquest amb l'ajut d'unes pinces gruixudes
4. Rentar l'abdomen de l'animal amb etanol 70% per evitar que a l'hora de disseccionar els pels interfereixin
5. Situar l'animal en posició decúbit supí, de manera que la cua queda en la part més distal
6. Amb l'ajut d'una lupa binocular (Leica), disseccionar l'animal obrint la cavitat peritoneal i apartar els òrgans fins localitzar el conducte biliar comú, també conegut com a colèdoc
7. "Clampar" el colèdoc en la seva part més distal, on connecta amb l'intestí
8. Realitzar un petit tall en la part proximal del colèdoc (part més propera al fetge) i inserir una cànula bisellada de plàstic unida a una xeringa de 27G
9. Inyectar 2ml de solució A de col·lagenasa P (Roche) (1.5mg de col·lagenasa P (Roche)/ml Hank's Balanced Salt Solution (Sigma)), observant que el pàncrees s'infla
10. Extreure el pàncrees i col·locar-lo sobre una placa de Petri (Soria Genlab) i treure el greix i els nòduls limfàtics que haguem pogut recollir

11. Col·locar el pàncrees un cop netejat en un Falcon de 50ml (Deltalab) que conté 1ml de solució B col·lagenasa P (Roche) (3.0mg col·lagenasa P (Roche)/ml de Hank's Balanced Salt Solution (HBBS) (Sigma)). Col·locar 2 pàncrees per tub
12. Col·locar els tubs en un bany a 37°C amb una agitació moderada durant 6 min
13. Col·locar els tubs en gel
14. Homogeneïtzar el contingut dels tubs amb una pipeta de plàstic Pasteur (Deltalab)
15. Aturar la reacció de digestió amb una solució freda de HBBS amb BSA (Bovine Serum Albumin). Centrifugar a 100g durant 5min a 4°C
16. Eliminar el sobrenedant, afegir més solució HBBS-BSA i homogeneïtzar. Passar la mostra per un colador per eliminar els trossos de pàncrees que no s'han digerit
17. Tornar a centrifugar a 100g durant 5min a 4°C
18. Eliminar el sobrenedant i re-suspendre el pèl·let corresponent a 2 pàncrees en 10ml de solució Histopaque 1.119g/L (Sigma)
19. Afegir amb cura de no trencar les fases del gradient 10ml de Histopaque 1.089g/L (barreja 1:1 de Histopaque 1.119g/L (Sigma) amb Histopaque 1.077g/L (Sigma))
20. Afegir amb cura de no trencar les fases del gradient 10ml de solució HBSS-BSA freda
21. Centrifugar a 829g durant 20min a temperatura ambient
22. Recollir els illots de la fase intermèdia, on tenim el Histopaque 1.089/HBSS-BSA i els passem a un tub de 50ml nou
23. Afegim 20ml de solució freda HBSS-BSA
24. Centrifugar a 500g durant 5min a 4°C
25. Eliminar el sobrenedant
26. Repetir els passos de rentat del 23 al 25 una vegada
27. Transferir els illots a una placa de Petri i procedir a la pesca amb l'ajut d'una lupa binocular (Leica), distingint els illots per la seva forma esfèrica, color blanc i un marge refringent.

IV. RESULTATS

1. LA CONNEXIÓ ENTRE ELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ bHLH NEUROG3 I MATH6 I LA VIA DE SENYALITZACIÓ WNT

1.1. IDENTIFICACIÓ DE GENS RELACIONATS AMB LA VIA WNT COM A DIANES DE NEUROG3 I MATH6

1.1.1. MICROARRAYS D'EXPRESSIONIÓ

Per a poder definir les cascades transcripcionals que guien els processos de diferenciació, és avantatjós poder fer ús de models *in vitro* que permetin identificar a nivell molecular els components d'aquests programes. En el cas del pàncrees, no hi ha bons models en cultiu cel·lular que permetin la caracterització molecular del programa de diferenciació endocrina. No obstant, aquest programa pot ser activat en determinats contextos cel·lulars mitjançant manipulacions genètiques basades en l'expressió forçada de factors de transcripció pro-endocrins. Per exemple, l'ús del model de les cèl·lules mPAC, explicat a la introducció (apartat 2.2.2.1), en les quals la sobreexpressió de Neurog3 promou l'activació del programa transcripcional de diferenciació endocrina, ha permès la identificació de dianes gèniques de Neurog3 (Lynn et al., 2007; Gasa et al., 2008; Lynn et al., 2008; Miyatsuka et al., 2011).

Amb l'objectiu d'ampliar el nostre coneixement sobre com els factors de transcripció bHLH Neurog3, i la seva diana Math6, regulen el programa de diferenciació endocrina, en el nostre grup vam fer ús del model de les cèl·lules mPAC i vam analitzar canvis globals en perfils d'expressió gènica, amb aproximacions de guany i pèrdua de funció d'aquests dos factors en aquesta línia cel·lular. Per una banda, es va comparar el perfil transcripcional de cèl·lules mPAC transduïdes amb un adenovirus recombinant que expressa Neurog3 humana (Ad.CMV-NEUROG3), amb cèl·lules control transduïdes amb l'adenovirus que expressa el gen de la β -Galactosidasa (Ad.CMV-bGal). Per altra banda, es van comparar els perfils transcripcionals de les cèl·lules mPAC transduïdes amb el Ad.CMV-NEUROG3 en combinació amb un adenovirus recombinant que contenia un shRNA específic per al gen de Math6 (Ad.CMV-shMath6), amb cèl·lules transduïdes amb Ad.CMV-NEUROG3

en combinació amb un shRNA control (que conté una seqüència nucleotídica aleatòria) (Ad.CMV-shControl).

Els *arrays* es van hibridar a la Unitat de Genòmica de la nostra institució. El RNA total de les cèl·lules es va retro-transcriure, marcar i hibridar amb els *arrays* del genoma de ratolí 430A 2.0 (Affymetrix, USA). Les dades obtingudes es van normalitzar mitjançant l'anàlisi robusta per a *multiarrays* (RMA, *Robust Multi-Array Analysis*), passant diferents controls de qualitat. Els resultats es van analitzar per a buscar diferències significatives amb el paquet LIMMA, ajustant els p-valors amb els mètodes de Benjamini i Hochberg.

Les condicions analitzades i els resultats obtinguts varen ser aquests:

Condicions experimentals	Nombre total d'<i>arrays</i> analitzats	Gens activats (>1.5)	Gens reprimits (<0.5)	Total gens modulats significativament
bGal/Neurog3	6	654	144	798
Neurog3+shMath6/ Neurog3+shControl	6	113	94	197

Utilitzant sistemes d'anàlisi informàtics que permeten l'agrupació dels gens diferencialment expressats segons la funció biològica que desenvolupen (*Ingenuity Pathways*, DAVID, etc...), vam definir diferents funcions cel·lulars modulades significativament en els *arrays* d'expressió:

- Cicle cel·lular
- Moviment cel·lular
- Creixement cel·lular i proliferació
- Senyalització intercel·lular i interacció
- Compromís cel·lular

Aquesta tesi es va iniciar amb la identificació d'un grup de gens relacionats amb la via de senyalització Wingless (Wnt), ja que aquesta estava altament representada d'entre el conjunt de gens implicats en senyalització intercel·lular.

1.1.2. LA VIA WNT COM A DIANA DE NEUROG3 I MATH6

Un cop identificada la via Wnt com a possible diana de Neurog3 i Math6, vam procedir a fer una anàlisi exhaustiva dels resultats obtinguts en els *microarrays* i vam comprovar, un per un, la possible relació dels gens identificats amb la via de Wnt en base a la bibliografia disponible. Vam identificar 22 gens relacionats directa o indirectament amb la via de senyalització Wnt (Taula 5). Vam classificar aquests gens en tres grups diferents: gens regulats únicament per Neurog3, gens regulats pel shMath6 i gens que són regulats tant per Neurog3 com per shMath6. És interessant el fet que Neurog3 i Math6 exerceixen efectes contraris sobre el grup de gens aparentment regulats per ambdós factors. Així que, si un gen és activat o reprimat alhora per Neurog3 i shMath6 implicaria que Neurog3 i Math6 tenen efectes oposats sobre l'expressió d'aquest gen.

En la taula 5 hi tenim representats gens que participen a diferents nivells de la via, hi observem tant lligands, com receptors, moduladors o dianes de la via. De la mateixa manera, també trobem gens que pertanyen a les diferents branques de les vies de Wnt, la via canònica Wnt/ β -Catenina o a les vies no canòniques Wnt/ Ca^{2+} o Wnt/PCP.

Vam verificar els resultats obtinguts en els *microarrays* per 15 dels gens identificats (*Apccdd1*, *Bambi*, *cFos*, *Igfbp4*, *Mitf*, *Nrarp*, *Cdkn1a*, *Prickle1*, *Rcan2*, *Rock2*, *Shisa2*, *Tcf7l2*, *Dkk1*, *Wnt7b* i *Wnt9a*) mitjançant PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR), podent comprovar que en tots els casos es corroboren els resultats obtinguts en els *arrays*, tal i com es mostra en la figura 26 per alguns dels gens testats.

Per a molts dels gens identificats, no hi ha evidències publicades de la seva expressió en el pàncrees embrionari i/o adult. Per aquesta raó hem analitzat la presència en pàncrees embrionari d'aquests, bé per PCR convencional o bé utilitzant l'aplicació del *GenePaint* (www.genepaint.org/Frameset.html), aplicació *on-line* que permet comprovar la presència o absència d'un determinat mRNA en embrió de ratolí a estadi de desenvolupament e14.5, mitjançant hibridació *in situ* amb sondes específiques.

GEN	SÍMBOL	PAPER A LA VIA	REGULAT PER Neurog3	FC	REGULAT PER shMath6	FC
REGULATS PER NEUROG3 ÚNICAMENT						
cyclin E2	Ccne2	Diana	activat	2,52	no	—
adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	APCDD1	Component intracel·lular	activat	2,16	no	—
frizzled homolog 6 (Drosophila)	Fzd6	Receptor	activat	1,60	no	—
leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5	Lgr5	Modulador i diana	activat	1,58	no	—
protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), beta isoform	Ppp2r1a	Component intracel·lular	activat	1,42	no	—
FBJ osteosarcoma oncogene	c-Fos	Diana	reprimet	0,65	no	—
frizzled homolog 5 (Drosophila)	Fzd5	Receptor	reprimet	0,63	no	—
wingless-type MMTV integration site 7B	Wnt7b	Lligand	reprimet	0,57	no	—
cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (flamingo homolog, Drosophila)	Celsr1	Modulador Via no canònica	reprimet	0,56	no	—
dickkopfhomolog 1 (Xenopuslaevis)	Dkk1	Modulador i diana	reprimet	0,43	no	—
REGULATS PER shMATH6 ÚNICAMENT						
pricklelike 1 (Drosophila)	Prickle-1	Modulador via no canònica	no	—	activat	1,62
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	Cdkn1a	Diana	no	—	activat	1,52
transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box	Tcf7L2	Efector	no	—	reprimet	0,64
Notch-regulated ankyrin repeat protein	Nrarp	Modulador	no	—	reprimet	0,51
REGULATS PER NEUROG3 I shMATH6						
BMP and activin membrane-bound inhibitor, homolog (Xenopuslaevis)	Bambi	Diana i modulador	activat	2,76	activat	2,10
shisahomolog 2 (Tmem46)	Shisa 2	Modulador	activat	2,4	activat	2,11
regulator of calcineurin 2	Rcan2	Component intracel·lular	activat	1,61	activat	1,50
microphthalmia-associated transcription factor	Mitf	Modulador nucli	activat	1,58	activat	2,15
wingless-type MMTV integration site 9A	Wnt9a	Lligand	activat	1,50	activat	1,81
transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1	Tbl1xr1	Modulador nucli	reprimet	0,80	reprimet	0,66
Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2	Rock2	Component intracel·lular Via no canònica	reprimet	0,80	reprimet	0,67
insulin-like growth factor binding protein 4	Igfbp4	Modulador	reprimet	0,70	reprimet	0,57

TAULA 5. Gens implicats en la via de senyalització Wnt que són regulats de manera significativa per Neurog3 i/o shMath6. Llistat de gens significativament regulats en resposta a Neurog3 i a shMath6 en cèl·lules mPAC, identificats mitjançant microarrays d'expressió. Els valors FC (*fold-change*) es refereixen a Neurog3/bGal en la columna 5, i a Neurog3+shMath6/ Neurog3+shControl en la columna 7.

Entre els gens estudiats destaquem:

El gen *Bambi* (BMP and activin membrane-bound inhibitor) que recentment s'ha proposat com a modulador de la via Wnt/ β -catenina (Lin et al., 2008). En aquest treball demostren com *Bambi* promou la translocació de β -catenina a nucli, a part d'interaccionar directament amb els components de la via Fzd5, Lrp6 i Dvl2. Anteriorment, també s'havia identificat *Bambi* com a diana de la via Wnt/ β -catenina en cèl·lules de càncer colorectal (Sekiya et al., 2004). Com s'observa en la figura 26, detectem *Bambi* en pàncrees de ratolí en estadi e14.5, indicant així que s'expressa durant el desenvolupament pancreàtic.

També hem mirat l'expressió del gen *Shisa2* (shisa homolog 2). *Shisa2* ha estat descrit com un modulador de la via de Wnt, així com també de la via de senyalització Fgf, a nivell de receptor (Hedge et al., 2008). Detectem l'expressió del seu mRNA als diferents estadis de desenvolupament pancreàtic estudiats, i a més, observem que la seva expressió està molt enriquida en illots adults.

Igfbp4 (insulin-like growth factor binding protein 4) ha estat descrit com un inhibidor de la via canònica de Wnt en teixit cardíac (Zhu et al., 2008), però per una altra banda també s'ha definit com un activador de la via sota un procés cancerós renal (Ueno et al., 2011). El mRNA de *Igfbp4* es detecta a nivells elevats en els diferents estadis de desenvolupament pancreàtic estudiats i el trobem també enriquit en els illots adults.

Cdkn1a (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A o p21/CIP1) és un inhibidor de la progressió del cicle cel·lular, que inhibeix l'activitat Cdk en les fases G1/S i G2/M del cicle (Sherr et al., 1995), a més d'unir-se a l'antigen nuclear de proliferació cel·lular PCNA (proliferating cell nuclear antigen) inhibint la replicació del DNA (Waga et al., 1994). Donada la relació directa entre Wnt i proliferació, és obvi pensar en la participació de p21 en la via de senyalització Wnt. De fet *p21* ha estat descrit com un gen diana no molt primerenc de la via (Rohrs et al., 2009). En la figura 26 podem observar la presència de *Cdkn1a/p21* en pàncrees embrionari de ratolí a e14.5. Recentment s'ha identificat p21 com a diana de Neurog3, i s'ha suggerit la necessitat de l'expressió de *Cdkn1a*, per sota de Neurog3, en les cèl·lules progenitores endocrines per a que aquestes surtin de cicle i deixin de proliferar (Miyatsuka et al., 2011).

Tcf7l2 també ha estat localitzat en pàncrees embrionari de ratolí i la seva participació en la via Wnt està àmpliament descrita com a efector de la cascada, tal i com s'exposa a la introducció, així com la seva possible implicació en la funcionalitat de la cèl·lula β i en la susceptibilitat a la diabetis tipus 2. Com és d'esperar, *Tcf7l2* s'expressa durant l'embriogènesi pancreàtica, tal i com podem observar en la figura 26.

Rcan2 (Regulator of Calcineurin 2) ha estat definit com a membre de la via no canònica Wnt/ Ca^{2+} , i recentment s'ha descrit com un gen que participa en el control de l'obesitat en ratolí (Sun et al., 2011). *Rcan2* també es coneix amb el nom de Calcineurin inhibitory protein ZAKI-4. Els resultats obtinguts indiquen que *Rcan2* s'expressa al pàncrees en els diferents estadis de desenvolupament estudiats i està enriquit en els illots adults de ratolí.

En conjunt, aquests resultats mostren que els factors bHLH Neurog3 i Math6 modulen l'expressió gènica de diferents gens relacionats amb la via Wnt, suggerint un lligam entre ambdós factors de transcripció i aquesta via de senyalització intracel·lular. Aquestes observacions suggereixen un paper potencial de la via Wnt sobre el programa de diferenciació endocrino-pancreàtica.

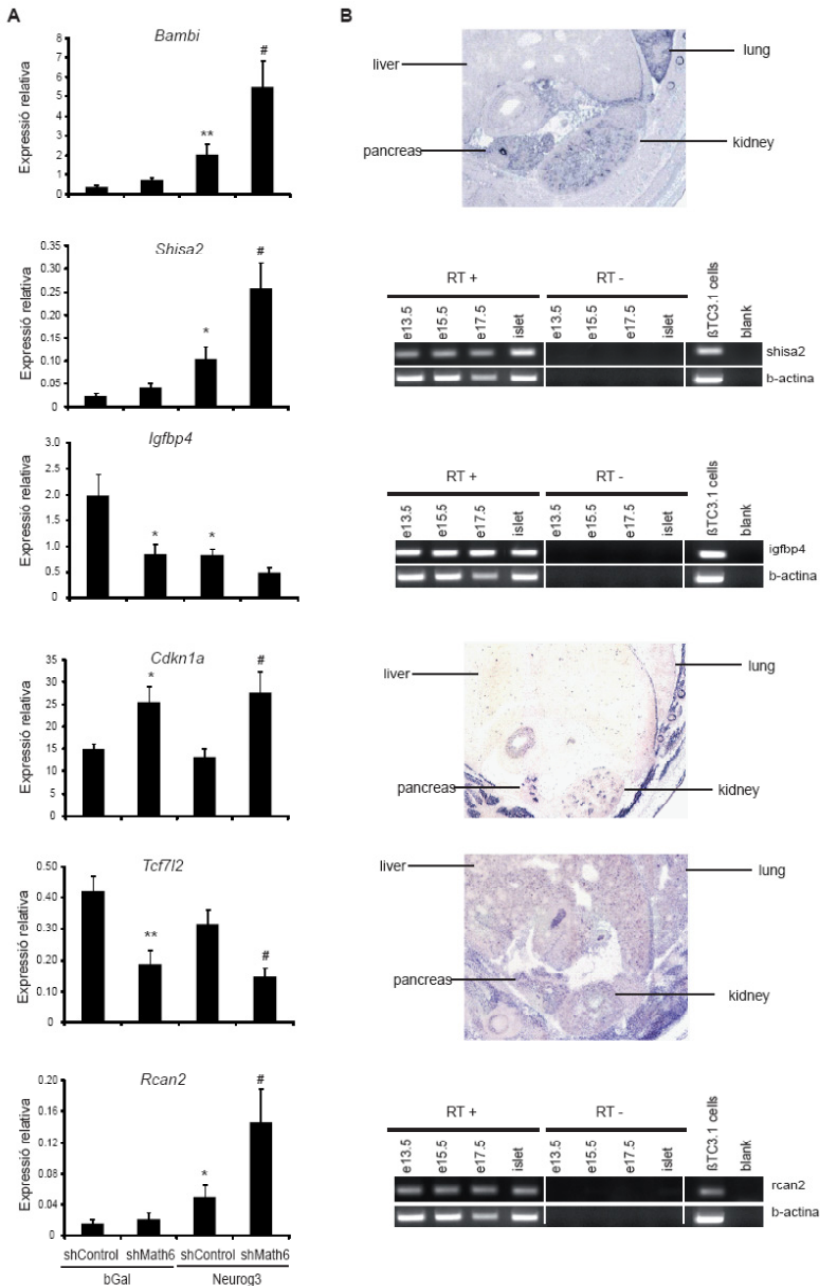


FIGURA 26. Comprovació per qRT-PCR i presència en pàncrees embrionari d'alguns gens diferencialment expressats en el *microarray*. (A) Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb les diferents combinacions d'adenovirus indicades (bGal, Neurog3, shControl i shMath6). 42-44h després de la infecció es va extreure RNA total. Els nivells d'expressió van ser analitzats per qRT-PCR. Les barres representen mitjana±SEM com a mínim per a 3 experiments independents i l'expressió està normalitzada respecte de l'expressió del gen Tata-binding protein (TBP). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs bGal+shControl; # $p < 0.05$ vs Neurog3+shControl (test estadístic de la t-student). (B) Presència al pàncrees embrionari i a illots isolats adults dels mRNA pels gens indicats corroborada mitjançant RT-PCR (gen de la beta-actina (Actb) com a control intern), o mitjançant hibridació *in situ* utilitzant l'eina *on-line* del *GenePaint*.

1.2. REGULACIÓ DIRECTA DE LA VIA CANÒNICA WNT/ β -CATENINA PELS FACTORS bHLH NEUROG3 I MATH6

Els resultats obtinguts fins al moment indiquen que, tant Neurog3 com Math6, tindrien la capacitat de modular la via de senyalització Wnt a través de la regulació de l'expressió de components o de reguladors de la mateixa. Aquí hem volgut establir si aquests factors també podrien tenir efectes directes sobre la senyalització Wnt, mitjançant la seva interacció física i/o funcional amb components nuclears d'aquesta via. Concretament, hem estudiat si Neurog3 i Math6 poden regular l'activació de la via canònica Wnt/ β -Catenina depenent de factors TCF.

1.2.1 EFFECTES DE NEUROG3 I MATH6 SOBRE L'ACTIVACIÓ DE LA VIA WNT

Per estudiar l'activació de la via canònica de Wnt vam utilitzar el sistema reporter de la luciferasa TOP/FOP-Flash. Aquest sistema consisteix en un vector d'expressió (TOP-Flash) que conté 8 llocs d'unió a factors TCF. Quan un gen reconeix aquests llocs d'unió s'hi uneix activant la transcripció del gen de la luciferasa. El control negatiu del sistema és el vector FOP-Flash que conté aquests 8 llocs d'unió a factors TCF mutats, impedit així l'activació de la via.

Les cèl·lules humanes HEK293 són àmpliament utilitzades per a l'estudi d'aquesta via ja que tenen una activitat basal de la via canònica de Wnt elevada. Com a control positiu d'activació de la via utilitzem el vector d'expressió per a la forma activa constitutiva de β -catenina, la qual indueix l'activitat basal de la via unes 50 vegades comparat amb el control. Com a control negatiu utilitzem un vector d'expressió que codifica pel dominant negatiu de Tcf712 (o Tcf4) (DN-Tcf712).

En la línia cel·lular HEK293, hem pogut observar com Neurog3 té la capacitat d'induir l'activitat basal de la via canònica de Wnt en aquestes cèl·lules (veure figura 27). Per contra, Math6 exerceix l'efecte oposat disminuint de manera significativa l'activitat basal de la via. A més, Math6 té la capacitat de reduir els efectes promoguts per β -catenina sobre l'activitat basal de la via, així com també de reduir la inducció que promou Neurog3. Aquests resultats ens mostren que Math6 pot regular negativament la via, mentre que Neurog3 n'és un activador.

Els estudis d'activació de la via Wnt poden donar resultats molt variables en funció del context cel·lular escollit, possiblement com a conseqüència de la diversitat de

receptors, co-receptors i lligands, així com de diferències en l'expressió de factors i co-reguladors intracel·lulars de la via. Per aquesta raó, també hem assajat els efectes de Neurog3 i Math6 en un context cel·lular pancreàtic utilitzant diferents línies cel·lulars. Hem analitzat línies cel·lulars de llinatge endocrí (α -TC1.6 i β -TC3), exocrí (266) i ductals (mPAC). En totes elles, els nivells basals d'activació de la via Wnt canònica són molt baixos, i la seva capacitat d'activació per β -catenina és també molt discreta (dades no mostrades). De totes les línies estudiades, les cèl·lules mPAC són les que han donat resultats una mica més robustos i reproduïbles. Tot i així, al contrari del que hem vist a les cèl·lules HEK293, ni Neurog3 ni Math6 afecten l'activació basal de la via Wnt en aquesta línia cel·lular. Igualment, malgrat que β -catenina activa significativament la via (10 vegades) a les mPAC, tampoc hem observat cap efecte evident ni de Neurog3 ni de Math6 sobre aquesta activació (Figura 27).

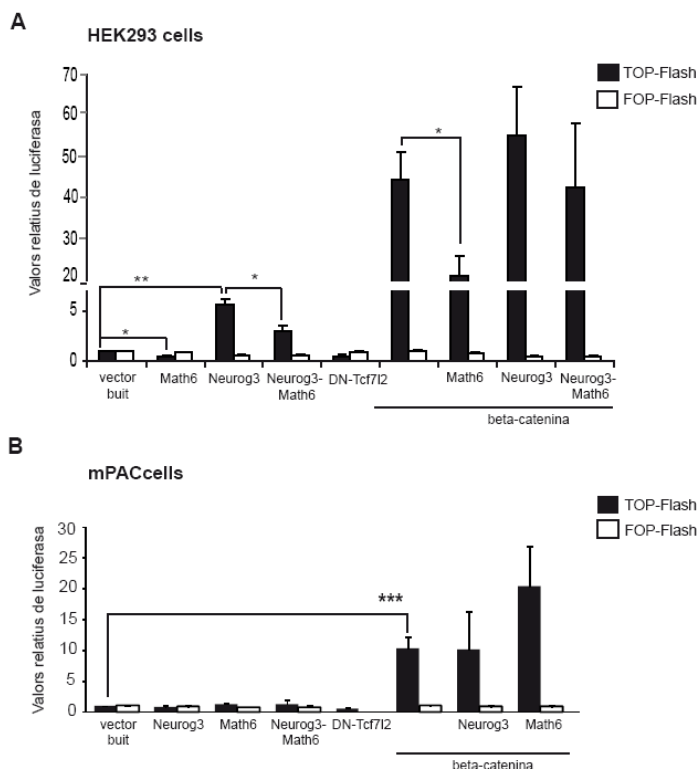


FIGURA 27. Activació de la via de senyalització Wnt per Neurog3 i Math6. Les línies cel·lulars HEK293 i mPAC han estat transfectades amb els vectors reporters de luciferasa TOP-Flash (negre) o FOP-Flash (blanc), amb els vectors d'expressió Neurog3 i/o Math6, la forma activa de beta-catenina o el dominant negatiu DN-Tcf7L2. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm SEM de com a mínim 4 experiments independents, i estan expressats relatius a l'activitat en presència del vector buit (activitat basal, al que s'ha donat el valor de 1). * p <0.05, ** p <0.01 i *** p <0.001 (test estadístic de la t-student).

En conjunt, aquests resultats indiquen que Neurog3 i Math6 tenen la capacitat de modular l'activitat transcripcional de factors TCF en determinats contextos cel·lulars (cèl·lules HEK293), però no en d'altres (cèl·lules mPAC). Això fa que no puguem descartar l'existència d'una possible regulació de la via de senyalització Wnt en resposta a aquests factors en el context cel·lular dels progenitors endocrins durant l'embriogènesi. En aquesta tesi, però, com a conseqüència de les diferències existents entre els models utilitzats, ens hem centrat en el paper de Neurog3 i Math6 com a reguladors de l'expressió gènica de components de la via Wnt.

2. IDENTIFICACIÓ DELS LLIGANDS WNT7B I WNT9A COM A POSSIBLES DIANES DE NEUROG3 I MATH6

Els gens que codifiquen pels lligands *Wnt7b* (wingless-type MMTV integration site family, member 7b) i *Wnt9a* (wingless-type MMTV integration site family, member 9a) són dos dels gens identificats en els *microarrays* d'expressió com a dianes potencials de Neurog3 (*Wnt7b*) i de Neurog3 i Math6 (*Wnt9a*).

2.1. COMPROVACIÓ RESULTATS DELS MICROARRAYS PER PCR A TEMPS REAL

L'expressió dels dos lligands, *Wnt7b* i *Wnt9a*, es comporta de manera oposada en resposta a Neurog3. Mentre que els nivells basals del mRNA de *Wnt7b* són elevats en les cèl·lules mPAC, els de *Wnt9a* són indetectables (veure figures 28 i 31). Quan sobreexpressem Neurog3 en aquestes cèl·lules observem una disminució en els nivells d'expressió de *Wnt7b*, just al contrari del que passa amb *Wnt9a*, que veu induïda la seva expressió.

El silenciament gènic de Math6 en solitari (shMath6 sol) no té cap efecte significatiu sobre l'expressió d'aquests lligands. En canvi, en el cas de *Wnt9a*, observem que en combinació amb Neurog3, el shMath6 incrementa els efectes promoguts per Neurog3 sola, el que ens estaria indicant que Neurog3 i Math6 tindrien efectes oposats sobre l'expressió d'aquest lligand. Pel que fa a *Wnt7b*, en el cas de la combinació Neurog3 i shMath6, no observem diferències en els nivells d'expressió del lligand.

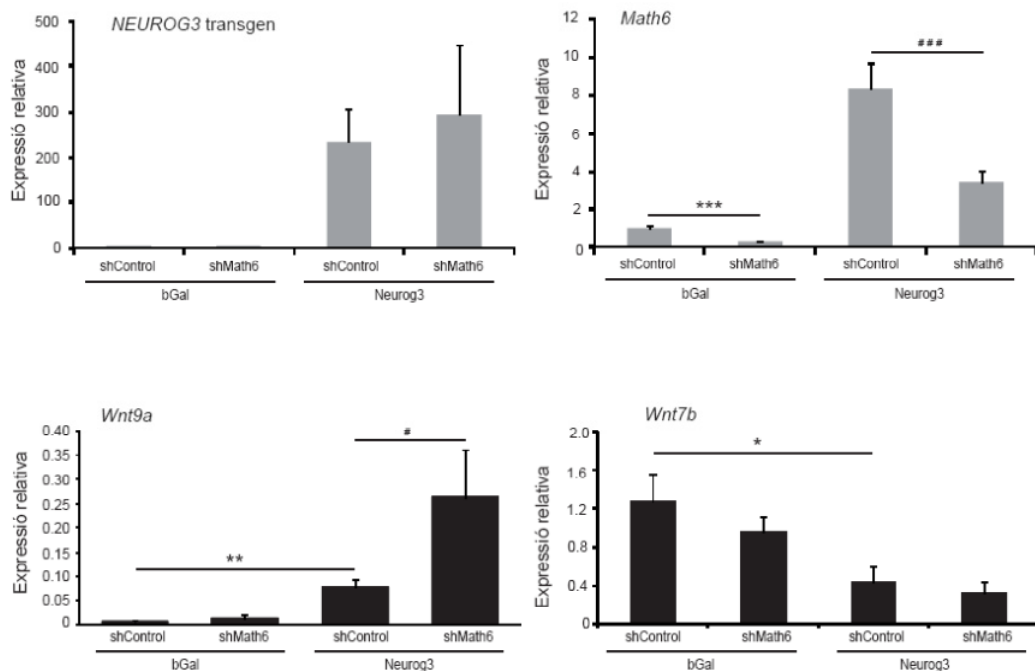


FIGURA 28. Regulació de l'expressió dels lligands Wnt9a i Wnt7b per Neurog3 i Math6. Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb les diferents combinacions d'adenovirus indicades (bGal, Neurog3, shControl i shMath6). Es van recollir les cèl·lules 42-44h després de la infecció per extreure'n RNA total. Els nivells d'expressió del transgen de *Neurog3*, *Math6*, *Wnt9a* i *Wnt7b* van ser analitzats per qRT-PCR. Les barres representen mitjana \pm SEM com a mínim per a 3 experiments independents i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen Tata-binding protein (TBP). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs bGal+shControl; # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ vs Neurog3+shControl (test estadístic de la t-student).

2.2. EXPRESSIÓ EN PÀNCREES EMBRIONARI DELS LIGANDS WNT7B I WNT9A

Com a pas preliminar abans d'aprofundir en el possible paper de Wnt9a i Wnt7b durant la diferenciació endocrino-pancreàtica, hem volgut comprovar que els dos lligands siguin expressats en el lloc i moment adequats per poder participar en aquest procés. L'expressió del mRNA de *Wnt7b* a pàncrees embrionari per PCR a temps real ha estat descrita amb anterioritat (Heller et al., 2002). En canvi, pel que fa a *Wnt9a* no hi ha cap publicació que en faci referència.

Inicialment, vam utilitzar la base de dades digital de *GenePaint* (www.genepaint.org/Frameset.html) que permet consultar els perfils d'expressió gènica obtinguts mitjançant hibridacions *in situ* a embrions de ratolí a l'estadi e14.5.

El mRNA del lligand *Wnt7b* s'expressa de manera evident en el pulmó, fet que corrobora el fenotip de l'animal deficient per aquest lligand (Shu et al., 2002; Rajagopal et al., 2008). També s'observa expressió en d'altres teixits, com per exemple estómac, ronyó, sistema auditiu, sistema olfatiu, llengua, etc. Tot i que l'expressió és més dèbil que en el cas del pulmó, també trobem expressió de *Wnt7b* en el pàncrees (Figura 29A). L'expressió pancreàtica d'aquest lligand sembla estar localitzada a les puntes de l'epiteli (*epithelial tips*) on es localitzen els progenitors pancreàtics exocrins a e14.5, tal i com passa amb *Rbpjl* (Hoffman et al., 2008), el que suggereix un perfil d'expressió acinar.

Per altra banda, el senyal del mRNA del lligand *Wnt9a* és en general és molt més dèbil que el de *Wnt7b* (veure figura 29A). Hi ha expressió feble de *Wnt9a* al sistema nerviós i esquelètic en general. No es detecta però cap senyal en el pàncrees. És possible que, o bé la qualitat de la sonda emprada per la hibridació *in situ* no sigui òptima, o que aquest lligand s'expressi de manera feble en aquest estadi de desenvolupament.

Com que la consulta de la base de dades *GenePaint* no ens aporta una resposta concloent respecte l'expressió de *Wnt9a* al pàncrees, hem estudiat la presència del mRNA per aquest lligand mitjançant RT-PCR convencional. Hem realitzat un estudi del perfil d'expressió dels lligands *Wnt9a*, *Wnt7b* i *Wnt5a* en una bateria d'òrgans de ratolí a estadi e15.5 (e15.5 coincideix amb el moment de màxima expressió de *Neurog3* al pàncrees i amb el pic de diferenciació endocrina). Amb aquests resultats podem corroborar l'expressió del mRNA de *Wnt9a* en els diferents teixits embrionaris estudiats, entre ells el pàncrees, amb diferents nivells d'expressió, a excepció del fetge en el qual no el detectem (Figura 29B). El mateix podem dir per *Wnt7b*, el mRNA del qual s'expressa de manera ubiqua en l'embrió de ratolí a estadi e15.5 en els diferents teixits analitzats i a diferents nivells d'expressió, a excepció, en aquest cas, del cor en el qual no detectem expressió d'aquest lligand.

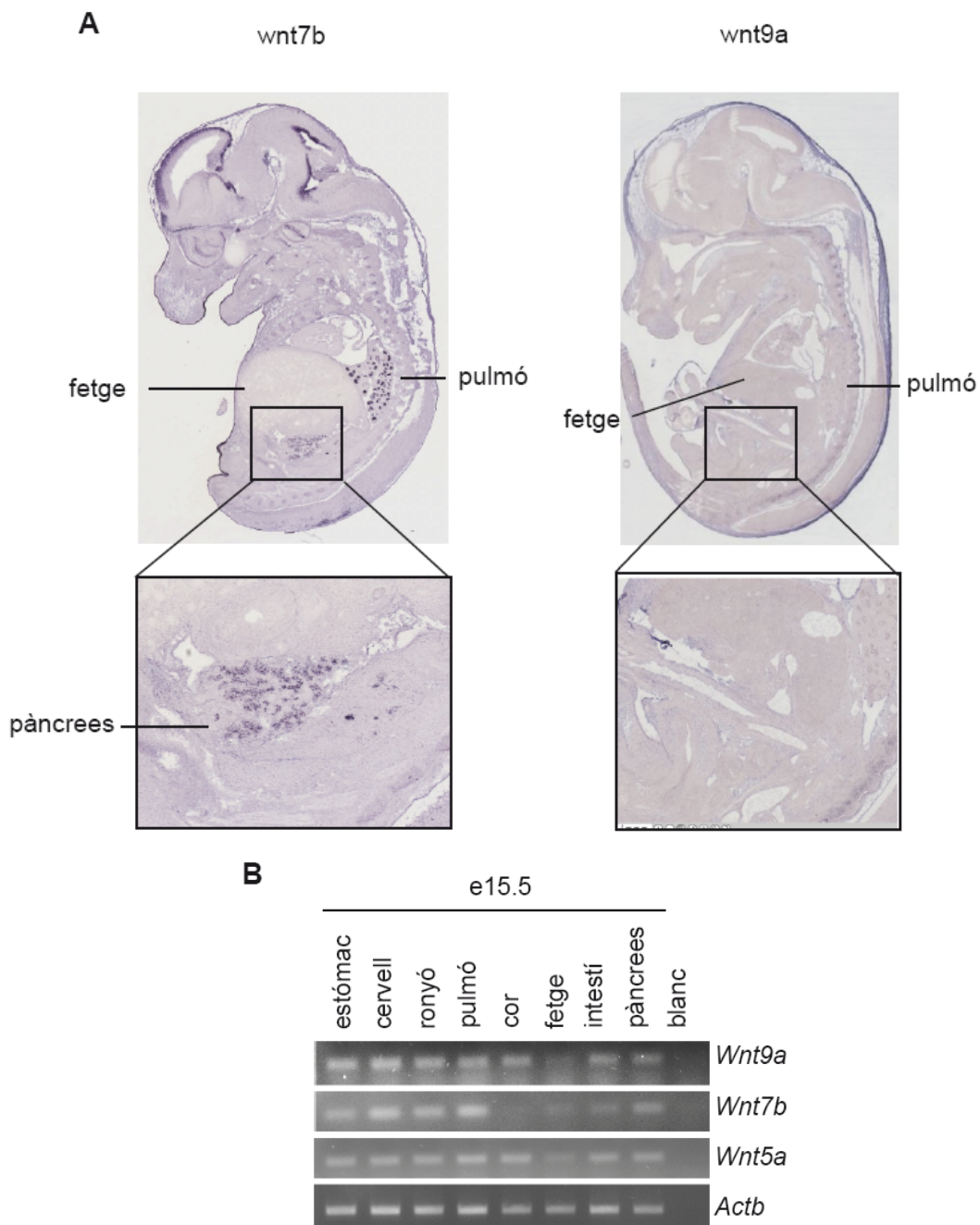


FIGURA 29. Expressió en teixits embrionaris dels lligands Wnt7b i Wnt9a. (A) Imatges de l'aplicació *on-line GenePaint* on es detecta per hibridació *in situ* l'expressió dels lligands Wnt7b i Wnt9a. (B) Els mRNA que codifiquen pels lligands de la via Wnt9a, Wnt7b i Wnt5a s'han analitzat per RT-PCR en els diferents teixits embrionaris de ratolí indicats extrets en l'estadi e15.5. El gen de la beta-actina (*Actb*) ha estat utilitzat com a control intern.

Un cop verificada la presència en pàncrees embrionari d'ambdós lligands, hem avaluat els seus perfils d'expressió durant el desenvolupament pancreàtic de ratolí, des de e13.5 fins e17.5 (un dia abans del final de la gestació) i en illots isolats de ratolí adult. A més dels mRNAs de *Wnt9a* i *Wnt7b*, hem analitzat també l'expressió de *Wnt5a*, prèviament descrit en el pàncrees embrionari (Heller et al., 2002) i del paràleg de *Wnt9a*, el lligand *Wnt9b*.

En general detectem expressió del mRNA per aquests lligands de Wnt, a excepció del lligand *Wnt9b*, en tots els estadis embrionaris estudiats. En el cas del gen *Wnt9a* podem veure que l'expressió és més o menys constant al llarg de l'organogènesi pancreàtica, cosa que no passa amb el seu paràleg, que no el detectem en cap dels estadis de desenvolupament pancreàtic estudiats. Pel que fa a *Wnt7b* i *Wnt5a* s'observa un patró d'expressió semblant, disminuint la seva expressió al llarg del desenvolupament (Figura 30).

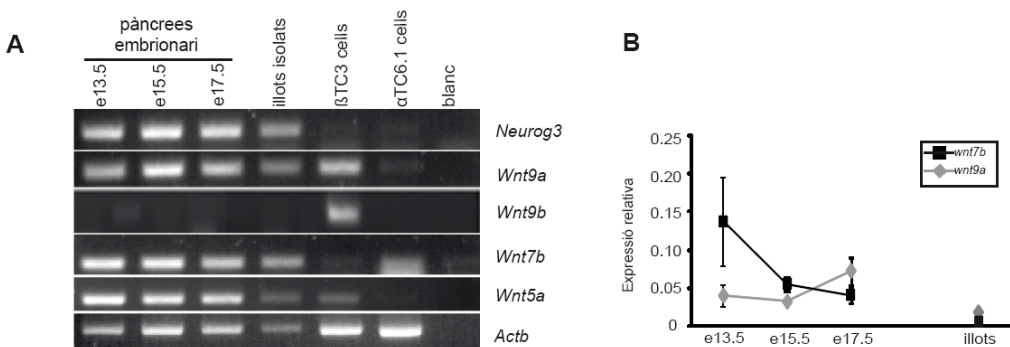


FIGURA 30. Expressió en pàncrees embrionari dels lligands *Wnt7b* i *Wnt9a*. (A) Els mRNA que codifiquen pels lligands de la via *Wnt9a* i *Wnt7b*, juntament amb *Neurog3*, *Wnt9b* i *Wnt5a* s'han analitzat per RT-PCR. El teixit pancreàtic de ratolí ha estat recollit als estadis embrionaris indicats i en illots adults. El gen de la beta-actina (*Actb*) ha estat utilitzat com a control intern. (B) Els mRNA que codifiquen per *Wnt9a* i *Wnt7b* s'han analitzat per qRT-PCR. Teixit pancreàtic de ratolí ha estat recollit als estadis embrionaris indicats i en illots adults. L'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen de TBP. Els resultats són la mitjana \pm SEM de com a mínim 3 mostres independents.

Per determinar de manera quantitativa l'abundància dels mRNAs dels gens *Wnt7b* i *Wnt9a* als diferents estadis de desenvolupament pancreàtic, hem utilitzat PCR a temps real. Trobem expressió elevada de *Wnt7b* en estadis primerencs, la qual disminueix a mesura que avança el desenvolupament. Per contra, *Wnt9a*, tot i

expressar-se més dèbilment que *Wnt7b* a e13.5, es manté més o menys constant al llarg de l'embriogènesi pancreàtica. L'expressió d'ambdós lligands en illot adult és detectable tot i que és molt dèbil (Figura 30B).

2.2.1 EXPRESSIÓ GÈNICA DELS LLIGANDS WNT7B I WNT9A EN DIFERENTS LÍNIES CEL·LULARS PANCREÀTIQUES

Hem estudiat la caracterització dels perfils d'expressió d'aquests lligands de Wnt, comparant la seva expressió en diferents línies cel·lulars murines pancreàtiques i no pancreàtiques: les línies endocrines α -TC1.6 (cèl·lules de glucagonoma), i β -TC3 i Min6 (cèl·lules d'insulinoma); la línia exocrina 266 i la línia fibroblàstica NIH-3T3 (Figura 31).

En el cas del mRNA de *Wnt9a*, el podem detectar a totes les línies estudiades a excepció de les cèl·lules mPAC, com ja hem descrit amb anterioritat. En canvi, només detectem expressió del mRNA de *Wnt7b* a la línia ductal mPAC i a l'acinar 266, suggerint un perfil d'expressió exocrí d'aquest lligand en el pàncrees. Aquesta observació coincideix amb el seu patró d'expressió suposadament exocrí en el pàncrees embrionari (veure figura 31).

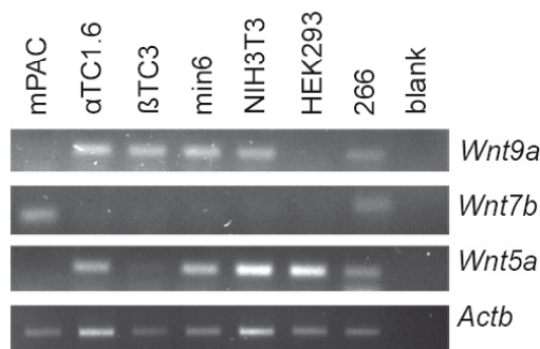


FIGURA 31. Expressió en línies cel·lulars dels lligands *Wnt9a*, *Wnt7b* i *Wnt5a*. Els mRNA que codifiquen pels lligands de la via *Wnt9a*, *Wnt7b* i *Wnt5a* s'han analitzat per RT-PCR en les línies cel·lulars indicades. El gen de la beta-actina (*Actb*) ha estat utilitzat com a control intern.

2.2.2 IDENTIFICACIÓ DE LES CÈL·LULES QUE EXPRESSEN WNT9A EN EL PÀNCREES

Un cop comprovada la presència del mRNA que codifica per *Wnt9a* al pàncrees embrionari, hem volgut identificar quines són les cèl·lules que expressen aquest lligand. Actualment existeixen dos anticossos comercials, de les cases Santa Cruz i Abcam, dels quals no existeix cap publicació. Hem testat els dos, no obstant, a les nostres mans, cap d'ells ha funcionat ni per *western blot* (emprant un vector d'expressió com a control positiu), ni per immunohistoquímica.

Com alternativa a la immunodetecció del lligand *Wnt9a* mitjançant anticossos específics, hem fet ús dels animals transgènics per a *Wnt9a* (que estudiarem en més profunditat a l'apartat 3 d'aquesta secció) els quals tenen substituït l'exó 2 per un cassette d'expressió del gen de resistència a la neomicina i del gen *LacZ*. Així, estudiarem la β -galactosidasa en animals heterozigots com a representació de l'expressió de *Wnt9a*.

En una primera aproximació, hem volgut detectar l'activitat β -galactosidasa mitjançant tinció amb X-Gal. Per una banda, hem realitzat la tinció sobre teixit fixat, tal i com mostra la figura 32. Tot i apreciar a nivell macroscòpic activitat β -galactosidasa (color blau), la tinció és dèbil i, al realitzar seccions per a poder estudiar a nivell microscòpic quines cèl·lules són les que presenten aquesta activitat β -galactosidasa, aquesta coloració es perd.

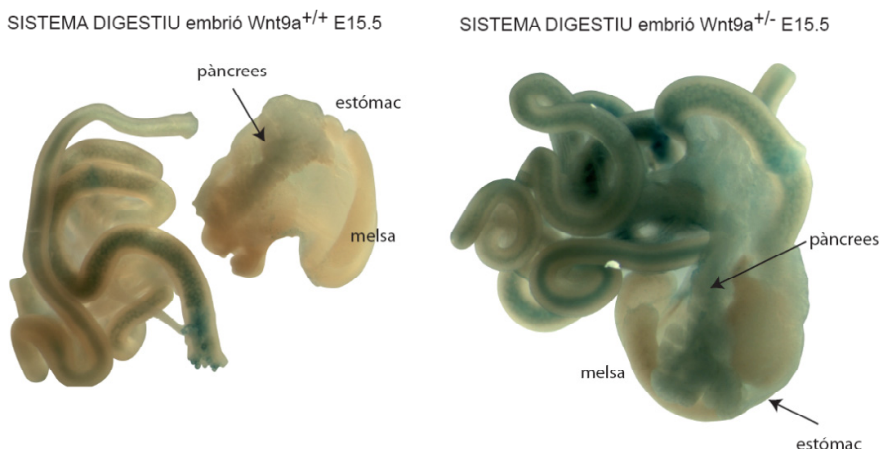


FIGURA 32. Sistema digestiu a e15.5 tenyit amb X-Gal. Els sistemes digestius d'animals *Wnt9a^{+/+}* i *Wnt9a^{+/-}* han estat recollits a estadi e15.5, pre-fixats i tenyits amb la tinció específica per x-Gal, tal i com s'indica en l'apartat de material i mètodes.

En un segona aproximació, hem emprat un anticòs específic per a β -galactosidasa, tant per immunodetecció en fluorescència com per activitat peroxidasa. Mitjançant les dues tècniques, però només en algunes mostres, hem detectat un senyal positiu citoplasmàtic dèbil en algunes cèl·lules aïllades no insulino-positives del pàncrees a e15.5 (veure figura 33).

Malauradament, i malgrat tots els esforços, fins aquest moment, no ens ha estat possible establir de manera conclusiva la identitat de les cèl·lules que expressen Wnt9a al pàncrees embrionari, possiblement degut al baix nivell d'expressió d'aquest lligand.

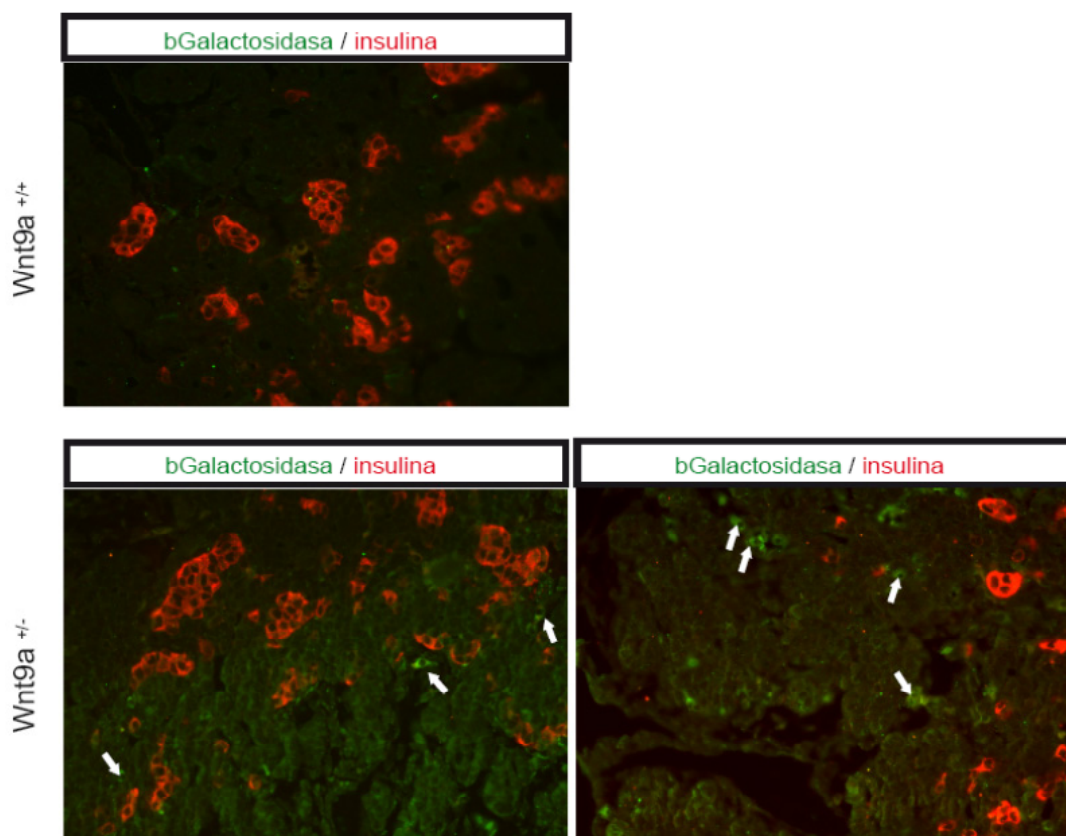


FIGURA 33. Detecció de β -galactosidasa amb un anticòs específic en pàncrees d'animals transgènics per Wnt9a a estadi de desenvolupament e15.5. Detecció per immunofluorescència de beta-galactosidasa (verd) amb co-tinció amb insulina (vermell) en un animal salvatge (Wnt9a^{+/+}) (part superior de la imatge) i un animal heterozigot (Wnt9a^{+/-}) (part inferior de la imatge).

2.3. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL LLIGAND WNT9A EN EL MODEL DE CÈL·LULES DUCTALS DE RATOLÍ mPAC

2.3.1 ACTIVACIÓ DEL GEN DE WNT9A PER PART DE NEUROG3

Hem estudiat les corbes temps-resposta i dosi-resposta de l'activació del gen de *Wnt9a* en resposta a l'expressió ectòpica de Neurog3 (Ad.CMV-NEUROG3) a les cèl·lules mPAC. Hem observat que la inducció ja és evident a baixes dosis d'adenovirus (moi 12.5). Emprant la dosi intermèdia que dóna una activació mitjana (moi 50), observem que es tracta d'una inducció ràpida (<24h) similar a la de *Math6* i clarament anterior a la de *NeuroD1*, una altra diana de Neurog3. En conjunt, aquestes evidències suggereixen que el gen *Wnt9a* podria ser una diana directa de Neurog3.

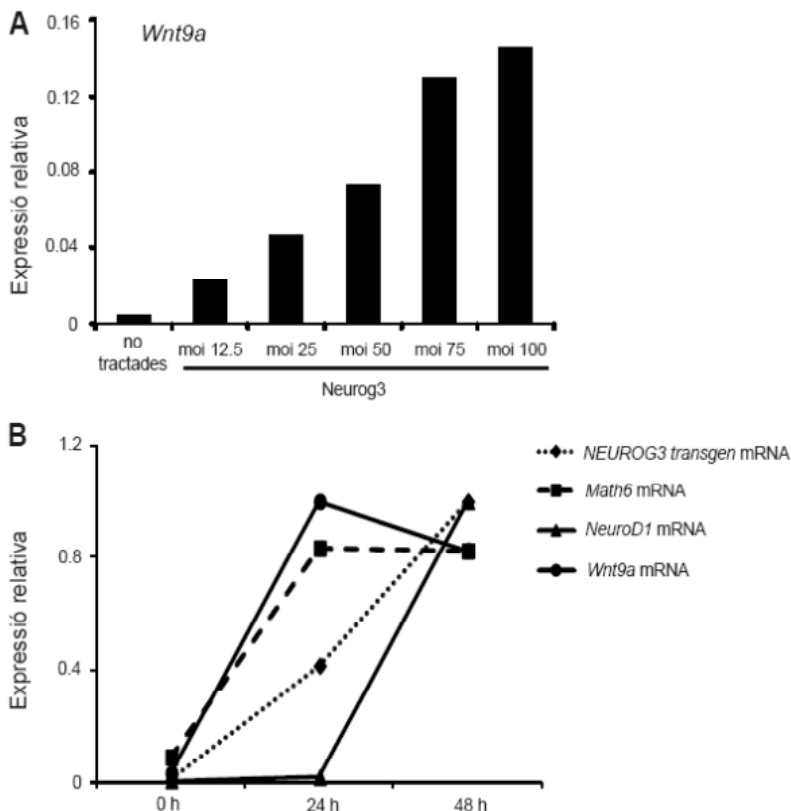


FIGURA 34. Corbes dosi-resposta i temps-resposta. (A) Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb els adenovirus Ad.CMV-NEUROG3 a les diferents dosis indicades i es va extreure RNA total 48 hores després de la infecció. L'expressió es va normalitzar en funció de l'expressió del gen de la glucoronidasa de ratolí (*mGus*). (B) Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb els adenovirus Ad.CMV-NEUROG3 i es va extreure RNA total 0, 24 i 48 hores després de la infecció. Es va analitzar l'expressió gènica dels gens indicats per qRT-PCR i l'expressió es va normalitzar en funció de l'expressió del gen de la glucoronidasa de ratolí (*mGus*).

- Activació de *Wnt9a* per Neurog3 en altres línies cel·lulars

Per tal d'avaluar si l'activació del gen de *Wnt9a* per part de Neurog3 era quelcom específic de les cèl·lules mPAC o era independent del context cel·lular, vam estudiar aquesta inducció en d'altres línies cel·lulars: P19 (cèl·lules derivades de teratocarcinoma de ratolí que poden activar el procés de diferenciació neuronal, en resposta a la inducció de factors bHLH proneurals) i NIH3T3 (cèl·lules fibroblàstiques de ratolí). En totes elles hem comprovat que Neurog3 indueix l'expressió del gen de *Wnt9a*, indicant que l'acció de Neurog3 sobre l'expressió del lligand no és una característica única de les cèl·lules mPAC. En la figura 35 mostrem les dades obtingudes en les cèl·lules p19 i NIH3T3.

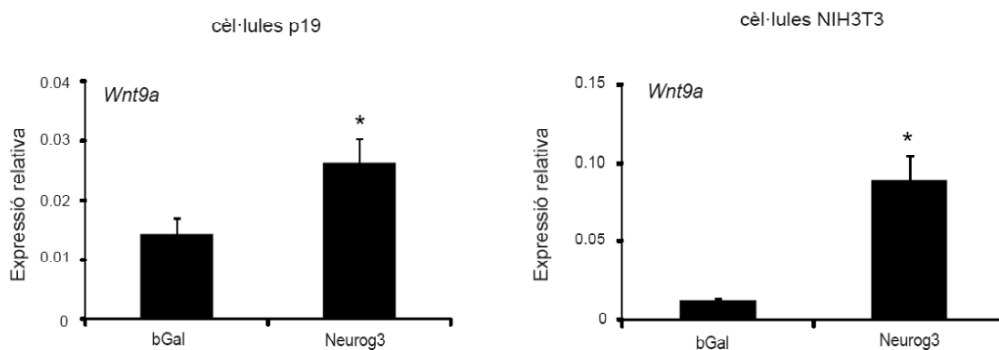


FIGURA 35. Expressió de *Wnt9a* en resposta a Neurog3. Les cèl·lules p19 i NIH3T3 van ser infectades amb els adenovirus Ad.CMV-bGal o Ad.CMV-NEUROG3 i es va extreure RNA total a les 42-44h hores després de la infecció. L'expressió del gen *Wnt9a* es va analitzar per qRT-PCR i l'expressió es va normalitzar en funció de l'expressió de *TBP*. Les barres representen la mitjana±SEM de 3 experiments independents en el cas de les cèl·lules p19, i de 2 en el cas de les NIH3T3. * $p < 0.05$ vs bGal.

2.3.2 MODIFICACIONS EPIGENÈTIQUES DE LA REGIÓ PROMOTORA DE WNT9A EN RESPOSTA A NEUROG3

L'activació transcripcional està íntimament relacionada amb canvis en l'estructura de la cromatina. Hem volgut mirar si l'activació del gen de *Wnt9a* promoguda per Neurog3 correlaciona amb canvis en modificacions post-traduccionals d'histones que s'associen a dominis de cromatina activa i inactiva. Concretament, hem estudiat la dimetilació (me2) i la trimetilació (me3) de la histona 3 en la lisina 4 (H3K4) que

s'associa amb una cromatina activa. I també hem estudiat la trimetilació de la histona 3 en la lisina 27 (H3K27) que s'associa a marques repressives de la cromatina. S'ha demostrat que aquestes marques són importants per determinar l'activació o la repressió de gens importants durant el desenvolupament (Bernstein et al., 2005; Mikkelsen et al., 2007).

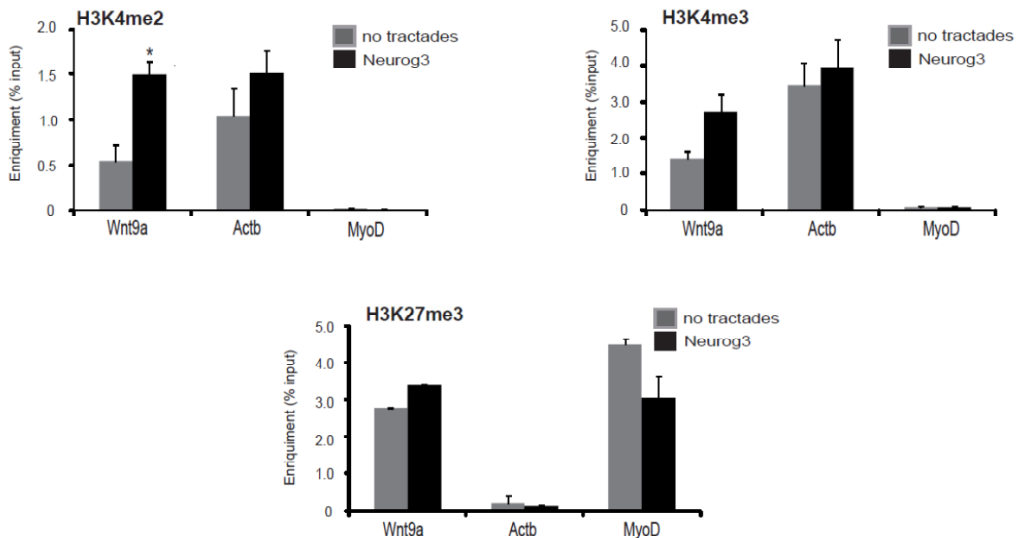


FIGURA 36. Estudi dels canvis a la cromatina del gen *Wnt9a* en resposta a Neurog3. Les cromatines de cèl·lules mPAC no tractades o infectades amb l'adenovirus recombinant de Neurog3 han estat immunoprecipitades amb els anticossos específics per Histona3 lisina4 dimetilada (H3K4me2) i trimetilada (H3K4me3) i la Histona 3 lisina 27 trimetilada (H3K27me3). El DNA associat ha estat analitzat per qRT-PCR pels promotors proximals dels gens *Wnt9a*, *Actb* i *MyoD*. Els resultats s'han expressat en relació a l'enriquiment de l'input. Les barres representen la mitjana \pm SEM de com a mínim 2 experiments independents i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*. * $p < 0.05$ vs cèl·lules no tractades (test estadístic de la t-student).

Hem observat un enriquiment significatiu en el cas de H3K4me2, i una tendència per a H3K4me3, en presència de Neurog3 al promotor proximal del gen *Wnt9a*, fet que correlaciona amb l'activació d'aquest gen. Cal observar que, tot i que el mRNA de *Wnt9a* en les cèl·lules mPAC és indetectable, el promotor de *Wnt9a* presenta enriquiment en les marques de metilació H3K4me2 i H3K4me3, que és clarament superior al de *MyoD*, utilitzat com a control negatiu ja que no s'expressa en aquesta

línia cel·lular, però és molt menor del que s'observa al promotor de la beta-actina (*Actb*). El gen *Wnt9a* també està enriquit en la marca repressiva H3K27me3 en estat basal en les cèl·lules mPAC i aquesta marca no desapareix en presència de *Neurog3* (veure figura 36). La co-expressió d'aquestes marques de la cromatina oposades va ser descrita originàriament en cèl·lules mare embrionàries i se li va donar el nom de dominis bivalents (Bernstein et al., 2005; Mikkelsen et al., 2007), el quals es van associar a gens clau de desenvolupament en aquestes cèl·lules. Aquests gens solen ser transcrits dèbilment però tenen l'avantatge que poden activar-se ràpidament en resposta a senyals de desenvolupament.

- Estat de la cromatina de la regió promotora de *Wnt9a* en pàncrees embrionari

Hem volgut comparar les dades obtingudes *in vitro* amb l'estat de la cromatina al promotor de *Wnt9a* *in vivo* i, amb aquesta finalitat, hem realitzat ChIP (immunoprecipitació de la cromatina) amb cromatina de primordis pancreàtics de e14.5. Hem trobat que el promotor de *Wnt9a* està enriquit en H3K4me2 i H3K4me3 en relació al gen pro-miogènic *MyoD*, inactiu en el pàncrees. De fet, trobem enriquiment similar d'aquestes marques actives al gen de *Neurog3*, però menor que el del gen *Actb* (veure figura 37). El fet que el promotor estigui enriquit en H3K4me2 com H3K4me3 dóna suport a que aquest gen està actiu en pàncrees embrionari.

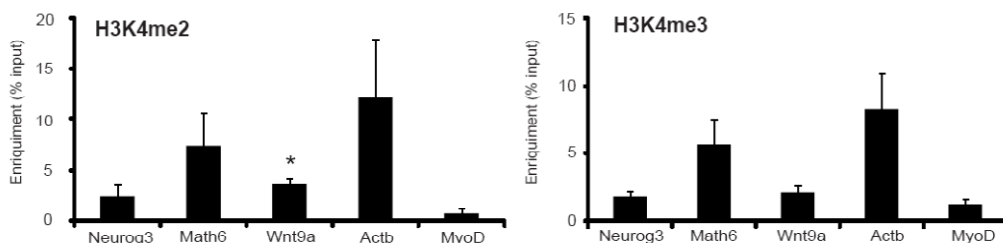


FIGURA 37. Estudi de l'estat de la cromatina en pàncrees embrionari. Les cromatines de pàncrees embrionari a e14.5 han estat immunoprecipitades amb els anticossos específics per Histona3 Lisina4 dimetilada (H3K4me2) i trimetilada (H3K4me3). El DNA associat ha estat analitzat per qRT-PCR pels promotors dels gens *Neurog3*, *Math6*, *Wnt9a* i *Actb*. Els resultats s'han expressat en relació a l'enriquiment dels inputs. Les barres representen la mitjana \pm SEM de com a mínim 2 experiments independents i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen TBP. * $p < 0.05$ vs *MyoD* (test estadístic de la t-student).

2.3.3 REGULACIÓ DEL GEN DE WNT9A PER ALTRES FACTORS bHLH

Hem volgut avaluar l'especificitat dels efectes de Neurog3 sobre el gen de *Wnt9a*. Amb aquest objectiu, hem estudiat l'expressió de *Wnt9a* en resposta a altres factors de la família dels bHLH que promouen processos de diferenciació en altres teixits, com per exemple el factor pro-neural Mash1, o el factor bHLH pro-miogènic MyoD.

Per una banda, el factor Mash1 activa *Wnt9a* de manera similar a la que ho fa Neurog3, mentre que MyoD també l'activa però de manera marcadament més dèbil. Per l'altra, els factors bHLH pro-exocrins Ptf1a o Mist1 (presentats en l'apartat 2.2.2.2 de la introducció) no exerceixen cap efecte sobre l'expressió del gen de *Wnt9a*, suggerint la connexió específica d'aquest lligand amb el compartiment endocrí del pàncrees (veure figura 38).

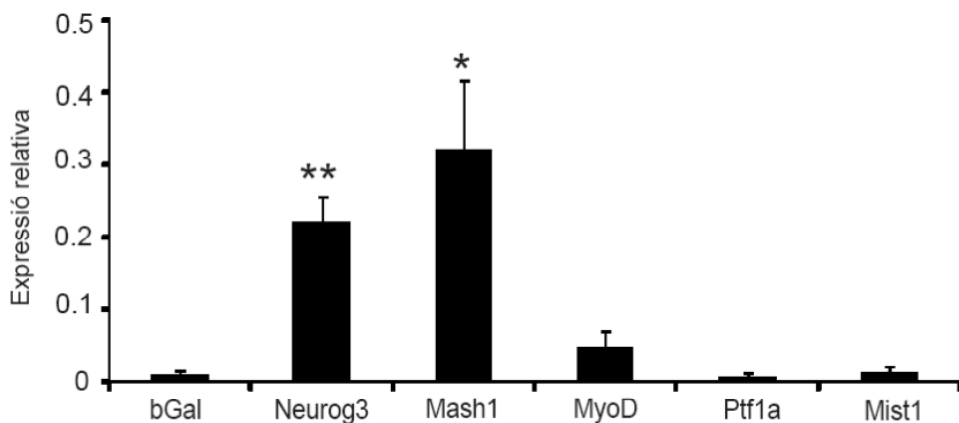


FIGURA 38. Regulació del gen de *Wnt9a* per factors bHLH. Regulació del gen de *Wnt9a* pels factors bHLH Neurog3, Mash1, MyoD, Ptf1a i Mist1. Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb els adenovirus indicats i es va extreure RNA total 48 hores després de la infecció. Els nivells d'expressió del gen *Wnt9a* van ser testats per qRT-PCR i van ser normalitzats respecte al gen de *TBP*. Les barres representen mitjana±SEM com a mínim per a 3 experiments independents i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*. * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ vs bGal (test estadístic de la t-student).

2.3.4 REGULACIÓ DEL GEN DE WNT9A PER COMPONENTS DE LA CASCADA ENDOCRINO-PANCREÀTICA

Per tal de caracteritzar amb més detall la posició que ocupa *Wnt9a* en la cascada de diferenciació endocrino-pancreàtica hem estudiat com altres factors de transcripció endocrins, en solitari o combinats amb Neurog3, regulen el gen de *Wnt9a*. Hem

estudiat els efectes que exerceixen NeuroD1, Pax4, Nkx2.2 i Nkx6.1 sobre *Wnt9a*. Cal recordar que tots ells són dianes gèniques de Neurog3.

NeuroD1, un factor bHLH que pertany a la mateixa subfamília que Neurog3, activa l'expressió gènica de *Wnt9a* a un nivell semblant al que ho fa Neurog3. De la resta de gens estudiats, només Nkx6.1 per si sol indueix significativament l'expressió del gen de *Wnt9a*, però a nivells molt més discrets dels que ho fan Neurog3 i NeuroD1. A més, Nkx6.1 combinat amb Neurog3, igual que també ho fa Pax4, exerceixen un efecte potenciador a la inducció gènica promoguda per Neurog3 sobre el gen de *Wnt9a* (veure figura 39).

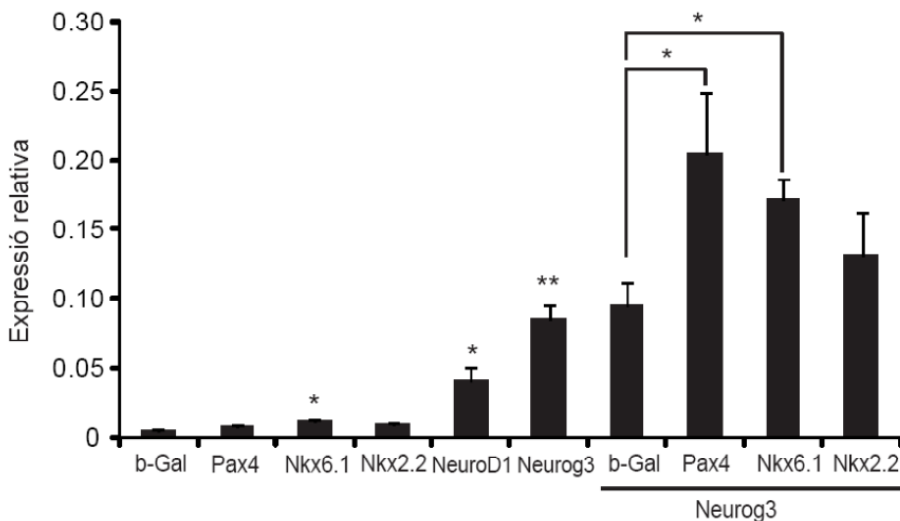


FIGURA 39. Regulació del gen de *Wnt9a* per factors de transcripció de la cascada endocrina. Regulació del gen de *Wnt9a* pels factors de transcripció endocrins Neurog3, NeuroD1, Nkx2.2, Nkx6.1 i Pax4 sols o en combinació amb Neurog3 o bGal com a control. Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb els adenovirus indicats i es va extreure RNA total 48 hores després de la infecció. Els nivells d'expressió del gen *Wnt9a* van ser testats per qRT-PCR i van ser normalitzats respecte al gen de *TBP*. Les barres representen mitjana±SEM com a mínim per a 3 experiments independents i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*. * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ vs bGal (test estadístic de la t-student).

Aquests resultats són interessants i revelen la possible existència d'un lligam entre *Wnt9a* i el destí cel·lular β ja que, tant Nkx6.1 com Pax4 són factors de transcripció específicament lligats a la formació del llinatge β del pàncrees (veure apartat 2.2.3 de la introducció).

L'anàlisi de 5 Kb de la regió genòmica no codificant anterior a l'inici de transcripció del gen de *Wnt9a*, amb el software Genomatix, ens ha permès identificar elements d'unió a factors bHLH (caixes E) i factors de transcripció específics de pàncrees al promotor de *Wnt9a*. Concretament, hem trobat llocs d'unió als factors de la família bHLH NeuroD/Neurog en diferents zones del promotor (aprox. 1Kb, 4Kb i 5Kb des de l'inici de transcripció (TSS)), així com també llocs d'unió a factors endocrino-pancreàtics Pax4/6 (aprox. 1,5Kb, 2 Kb, 3Kb i 4Kb des de TSS) o factors Nkx6 (aprox. 0,5Kb i 2Kb des de TSS). Els resultats obtinguts *in vitro* de regulació del gen de *Wnt9a*, estarien recolzant aquests resultats obtinguts *in silico*, indicant que aquests llocs d'unió serien funcionals (veure taula 6). També hem trobat llocs d'unió per altres factors de transcripció pancreàtics com Pdx1, Hnf1, Insm1 i Ptf1.

D'altra banda, a part dels factors més específics de compartiment, en el promotor de *Wnt9a* també hem trobat llocs d'unió a factors transcripcionals relacionats amb la senyalització de Wnt, com per exemple, a factors LEF1/TCF o al factor de transcripció Mitf.

FAMÍLIA GÈNICA	GEN	POSICIÓ D'INICI	POSICIÓ FI	CADENA DNA
NeuroD, Beta2, HLH domain	NEUR	637	649	-
		859	871	+
		860	872	-
		1461	1473	+
		1462	1474	-
		1974	1986	+
		1975	1987	-
		3714	3726	-
		4923	4935	+
		4924	4936	-
Pancreas transcription factor 1, heterotrimeric transcription factor	PTF1	1976	1996	+
		2691	2711	-
		2867	2887	+
		3704	3724	-
		4925	4945	+
NK6 homeobox transcription factors	NKX6	542	552	+
		2274	2284	+
		2311	2321	+

PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites	PAX6	1306	1324	+
		1390	1408	+
		1883	1901	-
		2159	2177	-
		3131	3149	+
		3198	3216	+
		3676	3694	+
		3686	3704	+
		3876	3894	+
Pancreatic and intestinal homeodomain transcription factor	PDX1	538	558	-
		2267	2287	+
		2304	2324	+
		2830	2850	-
Insulinoma associated factors	INSM	464	476	-
		946	958	+
		3331	3343	-
		3870	3882	-
		4096	4108	+
		4267	4279	+
Hepatic Nuclear Factor 1	HNF1	825	841	+
		4157	4173	+
LEF1/TCF	LEFF	180	196	+
		203	219	-
		328	344	+
		1900	1916	+
		2615	2631	+
		4054	4070	-
Microphthalmia transcription factor	MITF	1614	1632	-
		1681	1699	+
		2222	2240	-
		3654	3672	+

TAULA 6. Resultats obtinguts amb el software de Genomatix pel promotor de *Wnt9a*

2.4. PAPER DEL LLIGAND WNT9A EN EL PROGRAMA TRANSCRIPCIONAL ENDOCRÍ SOTA EL CONTROL DE NEUROG3

En base als resultats obtinguts fins ara, hipotetitzem que Wnt9a podria estar intervinent en el programa de diferenciació endocrina, per això hem investigat si el lligand Wnt9a pot regular la cascada transcripcional endocrina iniciada per Neurog3 a les cèl·lules mPAC. Amb aquesta finalitat, hem creat un vector adenovíric que expressa Wnt9a sota el control d'un promotor d'expressió constitutiva (CMV). El cDNA de *Wnt9a*, emprat per la construcció de l'adenovirus va ser clonat a partir de RNA total de cervell de ratolí recollit a l'estadi de desenvolupament e17.5.

Inicialment hem avaluat la correcta generació de l'adenovirus Ad.CMV-Wnt9a estudiant els nivells de mRNA de *Wnt9a* en cèl·lules mPAC infectades amb Ad.CMV-Wnt9a i/o Ad.CMV-NEUROG3 (Figura 40).

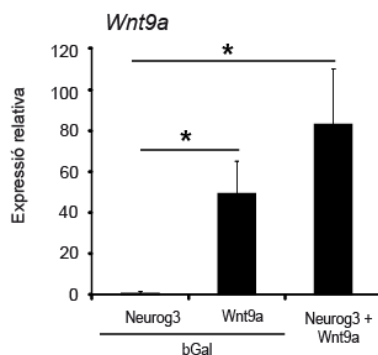


FIGURA 40. Comprovació de la sobreexpressió de Wnt9a. Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb les diferents combinacions d'adenovirus indicades (Ad.CMV-bGal, Ad.CMV-NEUROG3 i Ad.CMV-Wnt9a). Es van recollir les cèl·lules 42-44h després de la infecció per extreure'n RNA total. Els nivells d'expressió de *Wnt9a* van ser analitzats per qRT-PCR i estan representats respecte a Neurog3, a la que se l'hi ha donat el valor de 1. Les barres representen mitjana±SEM com a mínim per a 3 experiments independents i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*. * $p < 0.05$ (test estadístic de la t-student).

Un cop comprovada la sobreexpressió de Wnt9a, hem investigat el seu efecte sobre el programa de diferenciació endocrina induït per Neurog3 a les cèl·lules mPAC. D'una banda, la sobreexpressió de Wnt9a en solitari no induïx l'expressió de cap dels

gens estudiats propis de la cascada de diferenciació endocrina. En canvi, la sobreexpressió combinada de Wnt9a amb Neurog3 dona com a resultat el bloqueig significatiu de l'activació del gen del factor de transcripció *Pax4* i dels gens de les hormones *Sst* i *Iapp* (veure figura 41). S'observa una tendència similar pels gens *NeuroD1* ($P=0.07$) o el de la pròpia *Neurog3* ($P=0.08$). Per tant, Wnt9a podria estar exercint una regulació negativa sobre la funció pro-endocrina de Neurog3 a les cèl·lules mPAC. Podem dir però que aquesta regulació és gen-específica, ja que el bloqueig no és generalitzat sobre tots els gens estudiats. En la figura 41 tenim l'exemple de *Math6* o *IA-1* que no veuen afectada la seva activació en presència del lligand Wnt9a.

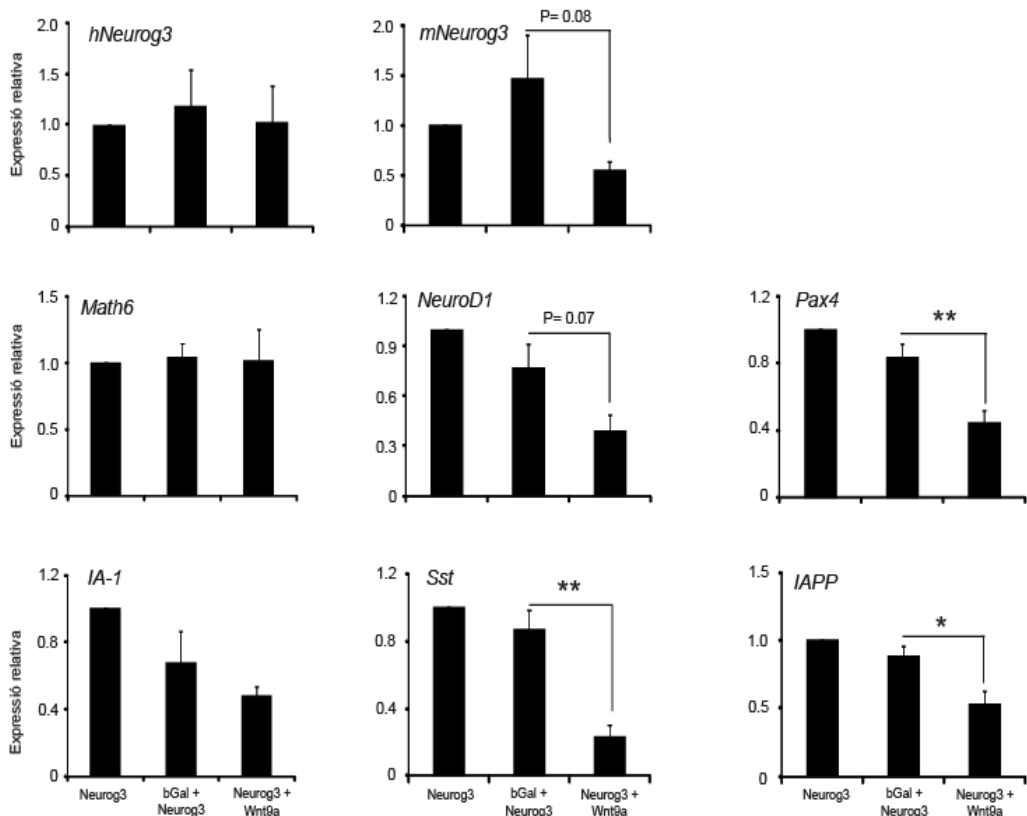


FIGURA 41. Estudi de l'efecte de la sobreexpressió de Wnt9a sobre la cascada endocrina activada per Neurog3. Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb les diferents combinacions d'adenovirus indicades (Ad.CMV-bGal, Ad.CMV-NEUROG3 i Ad.CMV-Wnt9a). Es van recollir les cèl·lules 42-44h després de la infecció per extreure'n RNA total. Els nivells d'expressió dels gens indicats van ser analitzats per qRT-PCR i estan representats respecte a Neurog3, a la que se l'hi ha donat el valor de 1. Excepte *Math6*, cap d'aquests gens s'expressa en cèl·lules mPAC no tractades amb Neurog3. Les barres representen mitjana \pm SEM com a mínim per a 3 experiments independents i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*. * $p<0.05$ i ** $p<0.01$ (test estadístic de la t-student).

També hem avaluat l'expressió d'algun dels gens relacionats amb la via Wnt i que havíem identificat previament en els *arrays*, com a gens modulats per Neurog3 i/o shMath6 (*Tcf7l2*, *Wnt7b*, *Shisa2*, *Rcan2*, *Rock2*, *Bambi* i *Mitf*), sobre els quals tampoc no veiem canvis (dades no mostrades), a excepció del lligand *Wnt7b*, la inhibició del qual en resposta a Neurog3 es veu parcialment bloquejada en presència de *Wnt9a* (Figura 42). L'expressió de *Wnt9a* individualment també té un efecte activador moderat sobre l'expressió de *Wnt7b*.

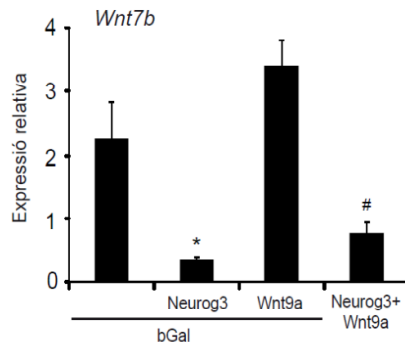


FIGURA 42. Estudi de l'efecte de la sobreexpressió de *Wnt9a* sobre l'expressió de *Wnt7b*. Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb les diferents combinacions d'adenovirus indicades (Ad.CMV-bGal, Ad.CMV-NEUROG3 i Ad.CMV-Wnt9a). Es van recollir les cèl·lules 42-44h després de la infecció per extreure'n RNA total. Els nivells d'expressió dels gens indicats van ser analitzats per qRT-PCR. Les barres representen mitjana \pm SEM com a mínim per a 3 experiments independents i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*. * $p < 0.001$ vs bGal i # $p < 0.01$ vs bGal-Neurog3 (test estadístic de la t-student).

En conjunt, els resultats obtinguts fins ara demostren que la sobreexpressió de *Wnt9a* interfereix amb l'activació de la cascada de diferenciació endocrina promoguda per Neurog3 en les cèl·lules mPAC. Per tant, la inducció de l'expressió de *Wnt9a* en resposta a Neurog3 podria ser un mecanisme destinat a regular l'activitat pro-endocrina d'aquest factor de transcripció.

2.5. ESTUDI DELS EFECTES DEL LLIGAND WNT9A SOBRE L'ACTIVACIÓ DE LA VIA WNT

La informació bibliogràfica disponible sobre els efectes del lligand *Wnt9a* a la via Wnt és escassa. El lligand *Wnt9a* ha estat definit com un activador moderat de la via canònica en diferents models (Guo et al., 2004; Person et al., 2005; Spater et al.,

2006; Matsumoto et al., 2008). Donada la variabilitat dels efectes dels lligands de Wnt en funció de context cel·lular on actuen, hem volgut estudiar els efectes de Wnt9a en el nostre model cel·lular d'estudi.

2.5.1. ACCIÓ AUTOCRINA DE WNT9A SOBRE LA VIA WNT CANÒNICA

Hem generat un vector d'expressió amb el cDNA de *Wnt9a* de ratolí (pCMV.TNT-Wnt9a) el qual hem transfectat juntament amb els vectors del sistema reporter de la luciferasa TOP/FOP-Flash (explicats a l'apartat 1.2.1 dels resultats) a les cèl·lules mPAC.

A les cèl·lules mPAC, on la capacitat d'activació de la via Wnt és en general moderada (veure efecte de la β -catenina, figura 41), Wnt9a augmenta només dues vegades l'activitat basal de la via. Aquesta inducció és menor que la observada amb el lligand Wnt3a que s'ha utilitzat com a control positiu d'activació de la via (www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/). El seu efecte però, sí que és comparable amb el del lligand Wnt7b, (que també ha estat descrit com a lligand canònic (Wang et al., 2005)), que augmenta a nivells similars als que ho fa Wnt9a.

Hem avaluat també els efectes de Wnt9a sobre les cèl·lules HEK293. Tal i com es mostra a la figura 43, veiem que Wnt9a no té efecte sobre la via Wnt/ β -catenina en aquesta línia cel·lular, a diferència del que observem amb el lligand Wnt3a que sí que té efectes activadors sobre la via.

De manera complementària, hem assajat també els efectes de Wnt9a en diferents línies cel·lulars pancreàtiques de llinatge endocrí (α -TC1.6 i β -TC3), exocrí (266) i en la línia no pancreàtica (NIH-3T3). En totes elles, els nivells basals d'activació de la via Wnt canònica són molt baixos, i la seva capacitat d'activació per β -catenina és també molt discreta (tal i com ja s'ha descrit en l'apartat 1.2.1 d'aquesta secció). En cap d'elles hem obtingut evidències d'activació de la via per part del lligand Wnt9a (dades no mostrades).

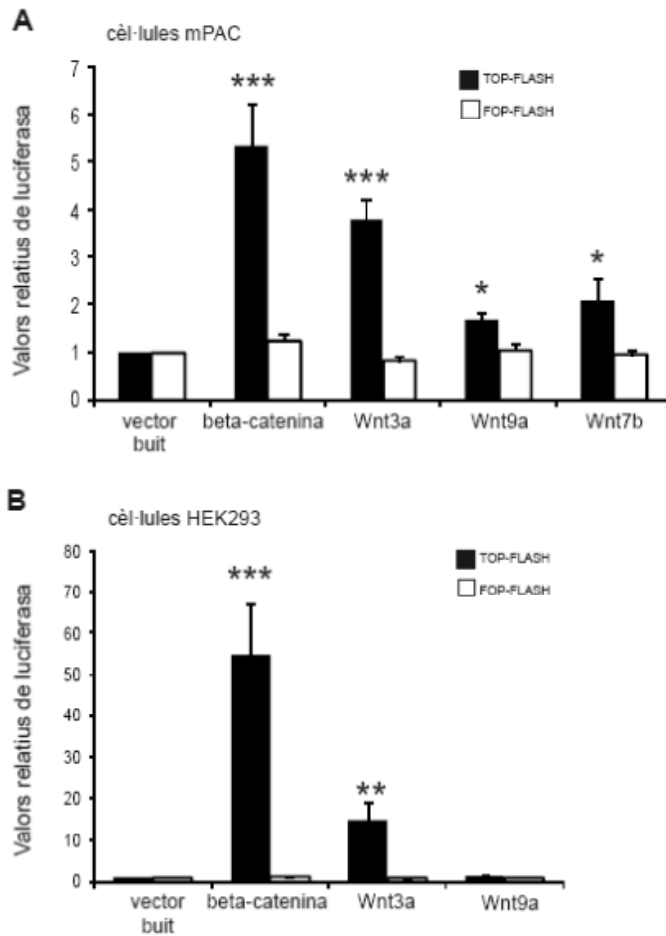


FIGURA 43. Activació de la via de senyalització Wnt/ β -catenina pel lligand Wnt9a. La línia cel·lular mPAC o la línia cel·lular HEK293 han estat transfectades amb els vectors reporters de luciferasa TOP-Flash (negre) o FOP-Flash (blanc), amb els vectors d'expressió Wnt3a, Wnt9a o Wnt7b i la forma activa de beta-catenina. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm SEM de com a mínim 3 experiments independents i estan expressats relatiu a l'activitat en presència del vector buit (activitat basal, al que se l'hi ha donat el valor de 1). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. vector buit (test estadístic de la t-student).

2.5.2. ACCIÓ PARACRINA SOBRE LA VIA WNT CANÒNICA

Els lligands de Wnt poden exercir efectes tant sobre la mateixa cèl·lula (efecte autocrí) com sobre les cèl·lules veïnes pròximes (efecte paracrí). En l'apartat anterior hem analitzat els efectes autocrins de Wnt9a (sobreexpressió de Wnt9a en les cèl·lules mPAC). En aquest apartat hem volgut estudiar l'acció paracrina d'aquest lligand. Per aquest motiu hem creat clons estables de la línia cel·lular NIH3T3 que

sobreexpressen el lligand Wnt9a de manera constitutiva i hem utilitzat el medi de cultiu d'aquestes (medi condicionat o secretoma) per estudiar l'activació de la via Wnt a les cèl·lules mPAC i HEK293.

A l'hora de crear les línies cel·lulars estables, i per tal de facilitar la immunodetecció del lligand (ja que com ha estat exposat amb anterioritat, no tenim bons anticossos), hem afegit una cua myc a l'extrem carboxi-terminal del cDNA de Wnt9a (pcDNA3.1-myc-Wnt9a). Inicialment, hem comprovat la correcta expressió del lligand, tant per nivells d'expressió del mRNA (per qRT-PCR) de *Wnt9a* com per detecció a nivell proteic (per immunohistoquímica) (Figura 44).

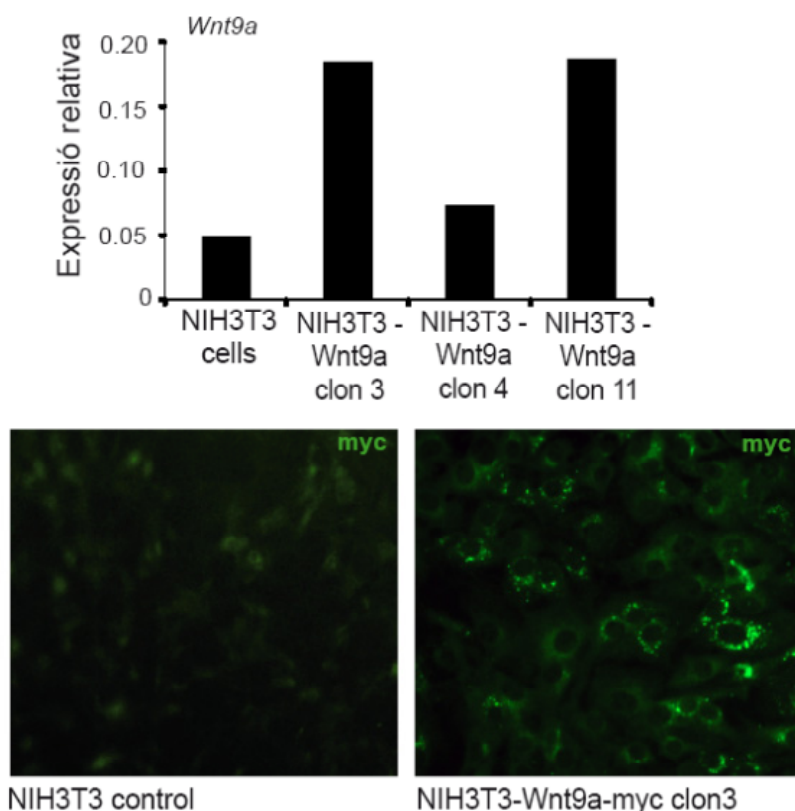


FIGURA 44. Creació de línies cel·lulars (clons) estables per a Wnt9a. S'han creat diferents línies cel·lulars estables (clons) de NIH3T3 que expressen de manera constitutiva el lligand Wnt9a. S'han testat els nivells d'expressió a nivell de mRNA per qRT-PCR (panell superior) o de proteïna per immunocitoquímica (panell inferior). Les barres representen els valors d'un únic experiment i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*.

Per a realitzar els experiments per a l'estudi de l'acció paracrina del lligand vam utilitzar el clon estable 3 (veure expressió citoplasmàtica del lligand a la figura 44). Vam deixar créixer les cèl·lules del clon fins a una confluència cel·lular elevada i vam recollir el medi condicionat d'aquestes. De la mateixa manera, vam recollir el secretoma de les cèl·lules control a una confluència similar. Seguidament el vam afegir a les cèl·lules mPAC o HEK293 un cop transfectades amb els vectors TOP o FOP-Flash.

Els resultats obtinguts mostren que el medi condicionat de les cèl·lules NIH3T3-Wnt9a indueix l'activació de la via canònica en les cèl·lules mPAC, però de manera moderada, comparat amb el medi condicionat de les cèl·lules control. Per altra banda, en les cèl·lules HEK293 no observem cap efecte (Figura 45). Per tant, aquests resultats són semblants als obtinguts amb la sobreexpressió de Wnt9a.

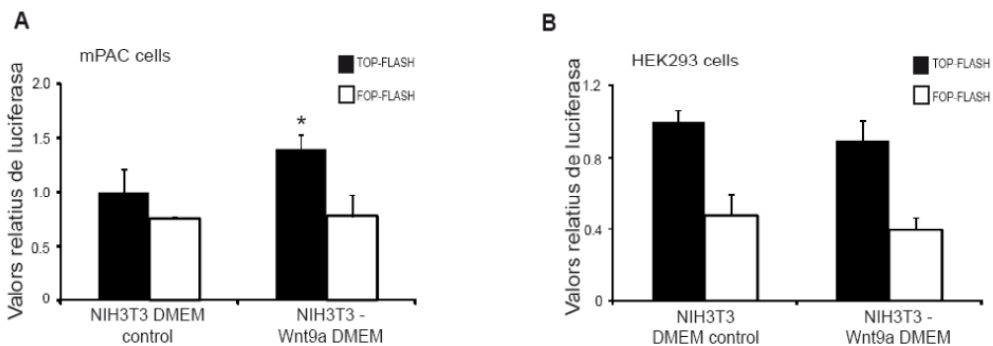


FIGURA 45. Activació de la via de senyalització Wnt pel lligand Wnt9a. La línia cel·lular mPAC o la línia HEK293 han estat transfectades amb els vectors reporters de luciferasa TOP-Flash (negre) o FOP-Flash (blanc) i incubades amb el secretoma de la línia NIH3T3 control o de la línia NIH3T3-Wnt9a-myc del clon 3. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm SEM de 3 experiments independents i estan expressats relatius a l'activitat en presència del medi control (activitat basal, al que se l'hi ha donat el valor de 1). * $p < 0.05$ vs. medi control (test estadístic de la t-student).

Concloem que Wnt9a activa la via Wnt canònica de manera moderada a les cèl·lules mPAC, característica que s'evidencia tant en els models d'activació autocrina com paracrina utilitzats. Al contrari, Wnt9a no té cap efecte sobre l'activació d'aquesta mateixa via a les cèl·lules HEK293. Tot i que desconeixem les bases moleculars d'aquestes diferències, és possible que siguin degudes almenys en part a l'expressió diferencial de receptors, co-receptors i altres reguladors de la via entre ambdues línies cel·lulars.

2.5.3. REGULACIÓ DE β -CATENINA I TCF7L2 PER WNT9A

Seguidament, hem avaluat la capacitat de Wnt9a de regular els nivells de β -catenina activa (forma defosforilada en els residus Ser37 o Thr41) en les cèl·lules mPAC. Els resultats indiquen que Wnt9a no promou canvis significatius en la defosforilació de β -catenina, el que suggereix que l'activació de la via Wnt canònica per part de Wnt9a en aquesta línia cel·lular no és mitjançant la modulació de la β -catenina (veure figura 46).

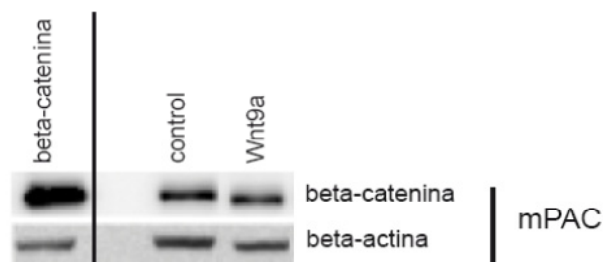


FIGURA 46. Regulació dels nivells de β -catenina per Wnt9a. La línia cel·lular mPAC ha estat transfectada amb vectors d'expressió per Wnt9a o per la forma activa de β -catenina i 48 hores després hem extret proteïna total del lisat cel·lular. Hem analitzat els nivells proteïcs de β -catenina activada per immunoblot amb un anticòs específic per la forma activa (no fosforilada) de la β -catenina. Hem utilitzat beta-actina com a control de càrrega.

S'ha descrit que els lligands Wnt també poden exercir el seu paper sobre la via Wnt mitjançant la regulació dels nivells d'expressió dels factors TCF efectors de la via (Bernardi et al., 2011). Per això, hem estudiat els efectes de Wnt9a sobre l'expressió de Tcf7L2 a les cèl·lules mPAC i hem trobat que Wnt9a provoca un augment en els nivells proteïcs de Tcf7L2 (Figura 47), suggerint que Wnt9a podria activar la via a través de la regulació de l'expressió de Tcf7L2. De manera interessant, hem observat que Neurog3 redueix l'expressió de Tcf7L2 en les cèl·lules mPAC, resultats que van en el mateix sentit que els efectes observats a nivell de mRNA (veure figura 26). La reducció dels nivells de Tcf7L2 en resposta a Neurog3 podria explicar la incapacitat d'aquest factor bHLH d'activar la via Wnt a les cèl·lules mPAC (veure figura 27).

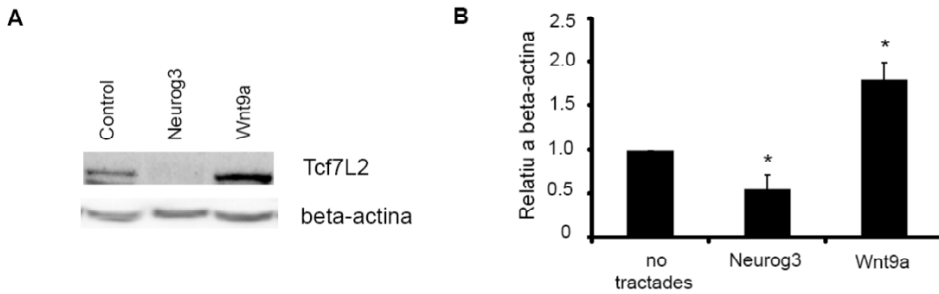


FIGURA 47. Regulació dels nivells proteics de Tcf7L2 en resposta a Neurog3 i Wnt9a. La línia cel·lular mPAC ha estat infectada amb l'adenovirus de Neurog3 o de Wnt9a. 48 hores després hem extret proteïna total del lisat cel·lular. (A) Hem analitzat els nivells proteics per immunoblot amb un anticòs per Tcf7L2 i hem utilitzat beta-actina com a control de càrrega. (B) Nivells relatius de Tcf7L2 analitzats per densitometria. Les barres representen la mitjana \pm SEM de 4 experiments independents. * $p < 0.05$ vs. cèl·lules no tractades (test estadístic de la t-student).

2.5.4. REGULACIÓ DE LES VIES NO CANÒNIQUES PER WNT9A

Finalment, i havent vist que els efectes de Wnt9a sobre la via canònica són febles, ens hem plantejat si aquest lligand podria exercir els seus efectes sobre les vies no canòniques de Wnt (Wnt/PCP i Wnt/Ca²⁺).

Hem utilitzat un *kit* basat en el sistema reporter de la luciferasa amb el sistema del *one-hybrid*, per estudiar l'activació de la via Wnt/PCP (Path-Detect® c-Jun trans reporting system, Stratagene). A les nostres mans, Wnt9a no sembla tenir efectes sobre aquesta via ni a les cèl·lules mPAC ni a les HEK293 (dades no mostrades).

En el moment de la finalització d'aquesta tesi no hem pogut avaluar quins són els efectes de Wnt9a sobre la via Wnt/Ca²⁺, el que no ens permet descartar una acció no canònica d'aquest lligand. Tampoc podem obviar la possible interconnexió entre diferents vies de senyalització intracel·lulars on Wnt9a podria estar jugant un paper important.

En resum, els resultats obtinguts fins ara demostren que:

- (i) el mRNA de *Wnt9a* s'expressa al pàncrees embrionari;
- (ii) l'expressió del gen de *Wnt9a* és regulada per Neurog3 així com pels components de la cascada transcripcional endocrina NeuroD1, Pax4 i Nkx6.1 i
- (iii) l'expressió del lligand *Wnt9a* pot alterar l'activació del programa de diferenciació endocrina en resposta a Neurog3 *in vitro* (Pax4, Sst o lapp).

En base a totes aquestes evidències, vam hipotetitzar que el lligand *Wnt9a* podia participar com un nou component del programa de diferenciació endocrina al pàncrees. En la tercera part d'aquesta tesi, hem analitzat el possible paper *in vivo* de *Wnt9a* en aquest programa, mitjançant l'estudi del model murí gen anul·lat per aquest lligand.

3. ESTUDI DEL FENOTIP PANCREÀTIC DEL MODEL MURÍ GEN ANUL·LAT DE WNT9A

Amb l'objectiu d'establir el paper del lligand Wnt9a en el procés de diferenciació endocrina del pàncrees, hem procedit a realitzar estudis *in vivo* amb el model animal gen anul·lat per a aquest lligand (Wnt9a^{-/-}). Aquests animals (tal i com s'ha descrit en la secció de la introducció) presenten una disrupció a l'exó 2 del gen, on hi ha inserit un cassette d'expressió del gen de resistència a la neomicina i del gen LacZ, que dóna com a resultat la traducció d'una proteïna anòmala i no funcional (Spater et al., 2006).

Els ratolins Wnt9a^{-/-} moren a les poques hores de néixer (durant les 12 primeres hores) per causes, hores d'ara, desconegudes. Els estudis generals realitzats en òrgans majors (cor, pulmó, fetge, intestí, cervell, tracte intestinal i ronyó) no revelen defectes macroscòpics evidents que expliquin aquesta letalitat primerenca dels nounats. Visualment, els ratolins Wnt9a^{-/-} es poden diferenciar dels ratolins salvatges (Wnt9a^{+/+}) i heterozigots (Wnt9a^{+/-}) de la mateixa ventrada perquè no mengen, fet que s'evidencia per la deficiència de llet a l'estómac (Spater et al., 2006).

En el moment de començar els nostres estudis no hi havia cap treball publicat sobre el fenotip pancreàtic dels animals Wnt9a^{-/-}.

3.1. CARACTERITZACIÓ DEL MODEL MURÍ WNT9A^{-/-} EN ESTADI POST-NATAL 1 (P1)

Tal i com hem dit anteriorment, els animals Wnt9a^{-/-} moren durant les 12 primeres hores de vida, per tant, els estudis fenotípics dels animals deficients en Wnt9a els hem pogut realitzar com a molt tard, a dia post-natal 1 (P1).

Els animals Wnt9a^{-/-} tenen un pes corporal similar al dels ratolins Wnt9a^{+/+} i Wnt9a^{+/-}. A nivell macroscòpic, no observem canvis importants en el pàncrees entre els diferents genotips. El pes pancreàtic relatiu al pes corporal tampoc és significativament diferent entre els animals Wnt9a^{-/-} i els animals salvatges i heterozigots (veure figura 48).

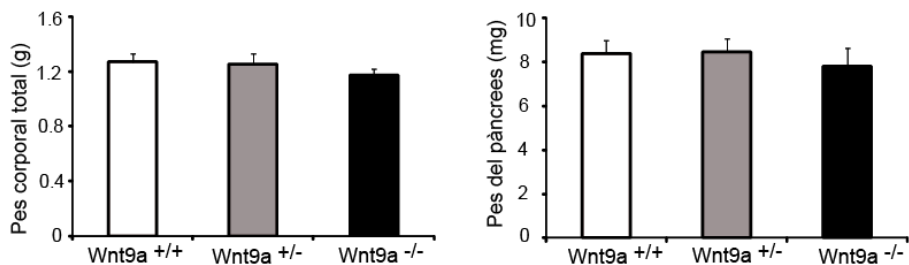


FIGURA 48. Estudi del fenotip dels animals deficients en Wnt9a a estadi post-natal 1 (P1). Pes corporal total dels animals (g), pes total del pàncrees (mg) a estadi post-natal 1 (P1), de 9 animals Wnt9a^{+/+}, 8 animals Wnt9a^{+/-} i 6 animals Wnt9a^{-/-}. Les barres representen mitjana±SEM.

En canvi, els animals Wnt9a^{-/-} són marcadament hipoglucèmics respecte dels animals Wnt9a^{+/+} o Wnt9a^{+/-} (veure taula 7), fet que es podria relacionar directament amb que aquests animals no mengen, com ja ha estat descrit amb anterioritat (Spater et al., 2006).

	Wnt9a +/+	Wnt9a +/-	Wnt9a -/-
GLICÈMIA (mitjana ± SEM)	44,13 ± 2,23	46,07 ± 2,75	24,78 ± 5,03 ^{**}
INSULINÈMIA (mitjana ± SEM)	1,99 ± 0,65	2,54 ± 0,38	0,50 ± 0,25 [*]

TAULA 7. Glicèmies i insulinèmies dels animals deficients en Wnt9a a estadi post-natal 1 (P1). Glicèmies i insulinèmies dels animals a estadi P1. Els valors representen mitjana±SEM de 24 animals salvatges (Wnt9a^{+/+}), 29 animals heterozigots (Wnt9a^{+/-}) i 9 gen anul·lats (Wnt9a^{-/-}). *p<0.05 i **p<0.001 vs. Wnt9a^{+/+} i Wnt9a^{+/-} (test estadístic per a la t-student).

D'acord amb aquesta possibilitat, veiem que la insulinèmia dels animals Wnt9a^{-/-} és significativament més baixa (aproximadament un 75% menys) que la dels animals control. En canvi, no detectem diferències en el contingut d'insulina pancreàtica entre genotips. En realitat, observem una tendència a un major contingut d'insulina (aprox.

20%) en els animals deficients en Wnt9a, tot i que no arriba a ser significativa (veure figura 49). Per tant, és poc probable que la hipoinsulinèmia dels animals $Wnt9a^{-/-}$ a P1 sigui deguda a deficiències en el contingut d'insulina pancreàtica mentre que podria estar directament relacionada amb la manca d'ingesta.

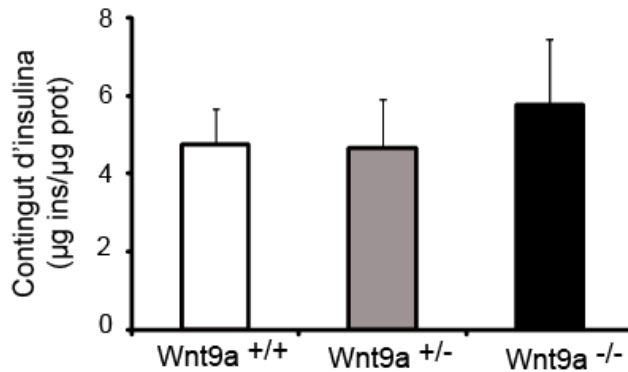


FIGURA 49. Contingut total de insulina dels pàncrees dels animals deficients en Wnt9a a estadi post-natal 1 (P1). Contingut total d'insulina (µg d'insulina relatiu als µg de proteïna) a l'estadi P1, de més de 3 animals per cada genotip. Les barres representen mitjana±SEM.

3.2. ANÀLISI DEL PÀNCREES ENDOCRÍ DELS ANIMALS $WNT9A^{-/-}$ A L'ESTADI EMBRIONARI (e)18.5

Amb la finalitat d'establir el possible paper de Wnt9a en la formació del pàncrees endocrí hem procedit a fer una anàlisi morfològica utilitzant seccions seriades de teixit pancreàtic fixat d'embrions $Wnt9a^{-/-}$ i $Wnt9a^{+/+}$ (controls) a l'estadi e18.5, coincidint amb el final de la gestació. La tinció realitzada per les hormones endocrines del pàncrees majoritàries (insulina, glucagó i somatostatina) no deixa entreveure diferències evidents en la diferenciació endocrino-pancreàtica entre els dos genotips. Ambdós, $Wnt9a^{+/+}$ i $Wnt9a^{-/-}$, presenten els tres tipus cel·lulars estudiats i no s'observen diferències de localització o distribució d'aquests (veure figura 50). No obstant, l'estudi morfològic detallat realitzat en aquest estadi mostra que els animals $Wnt9a^{-/-}$ presenten un nombre més elevat de cèl·lules endocrines en comparació amb els animals control (65%). Aquest augment afecta els tres tipus cel·lulars estudiats: les

cèl·lules β insulino-positives (65.93 ± 6.37 ; 93.02 ± 6.93 , $P < 0.05$, essent la mitjana \pm SEM de $Wnt9a^{+/+}$ i $Wnt9a^{-/-}$, respectivament), les cèl·lules α glucagó-positives (19.98 ± 0.9 ; 45.17 ± 10.82 , $P = 0.08$, essent la mitjana \pm SEM de $Wnt9a^{+/+}$ i $Wnt9a^{-/-}$, respectivament) i les cèl·lules δ somatostatina-positives (7.27 ± 0.78 ; 15.35 ± 1.92 , $P < 0.05$, essent la mitjana \pm SEM de $Wnt9a^{+/+}$ i $Wnt9a^{-/-}$, respectivament). Consistent amb aquestes dades, no observem canvis significatius en la distribució dels diferents subtipus endocrins respecte de l'àrea endocrina total (veure figura 51). Concloem, per tant, que l'absència de $Wnt9a$ provoca un augment significatiu del nombre de cèl·lules endocrines del pàncrees al final de la gestació.

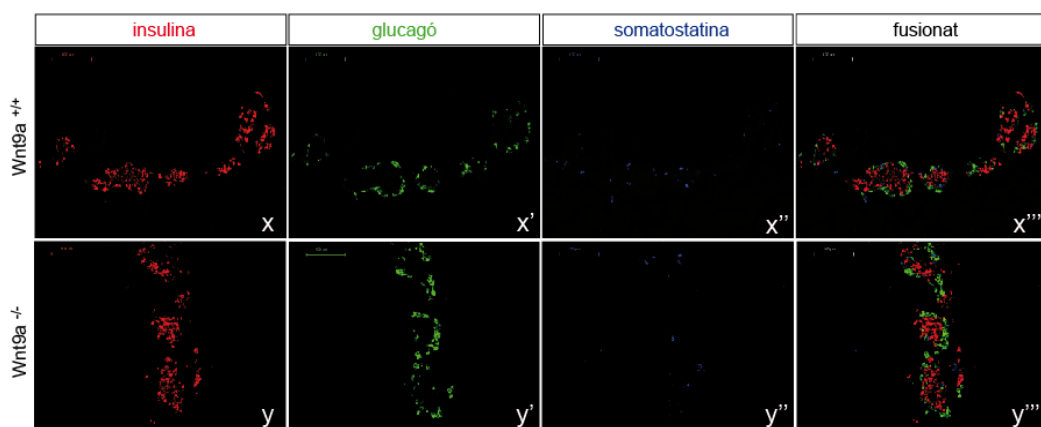


FIGURA 50. Tinció per les hormones pancreàtiques majoritàries a l'estadi e18.5 dels animals deficients en $Wnt9a$. El dia e18.5 de desenvolupament hem fet extracció del sistema digestiu embrionari, hem fixat i deshidratat i seguidament hem parafinitzat. Hem fet immunofluorescència de les hormones insulina (vermell), glucagó (verd) i somatostatina (blau) per a un animal $Wnt9a^{+/+}$ i un animal $Wnt9a^{-/-}$.

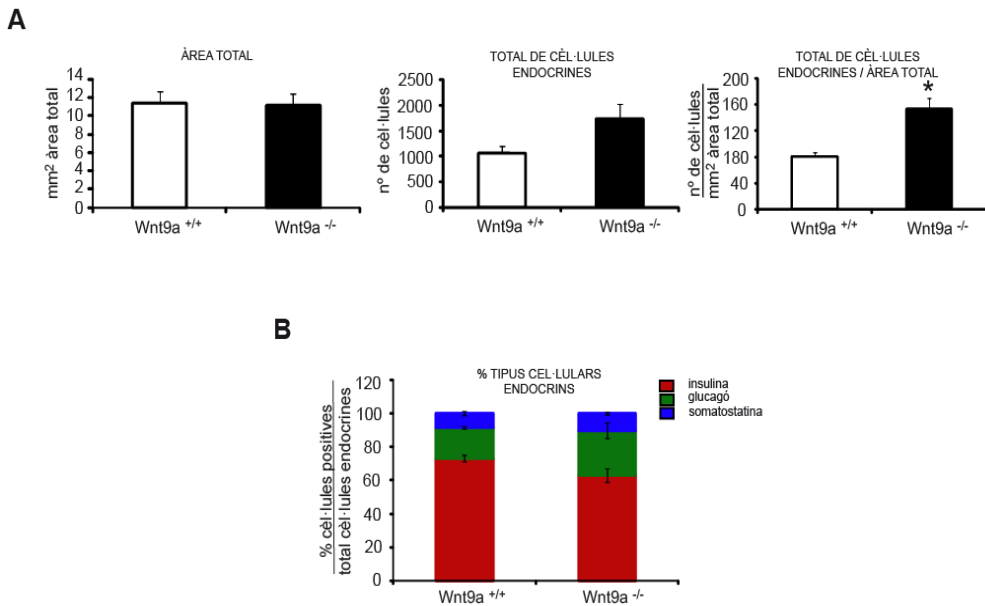


FIGURA 51. Estudi del fenotip dels animals deficients en Wnt9a a l'estadi de desenvolupament e18.5. Hem analitzat com a mínim 5 talls de cada embrió (de 3µm cada un) separats entre ells 90µm (5 animals de cada genotip) i hem representat (A) l'àrea total de pàncrees analitzada, el número total de cèl·lules endocrines (insulina, glucagó i somatostatina) i la relació entre aquests dos paràmetres, i (B) hem representat les cèl·lules endocrines positives per a cada tipus cel·lular respecte del número total de cèl·lules endocrines comptabilitzades. Les barres representen mitjana±SEM i *p<0.05 (test estadístic de la t-student).

3.3. ANÀLISI DEL PÀNCREES ENDOCRÍ DELS ANIMALS WNT9A^{-/-} A L'ESTADI EMBRIONARI (e)15.5

Amb l'objectiu d'establir les causes de l'augment de massa endocrina pancreàtica observada al final de la gestació en els animals Wnt9a^{-/-}, hem estudiat teixit pancreàtic a estadi e15.5, moment àlgid de la transició secundària quan es donen les ones de diferenciació endocrina i exocrina en el pàncrees embrionari.

3.3.1 ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PANCREÀTICA EN ANIMALS WNT9A^{-/-} A ESTADI EMBRIONARI (e)15.5

Hem volgut analitzar si l'augment de massa endocrina observada a e18.5 era deguda a un increment de la diferenciació endocrina promoguda per l'absència de Wnt9a. D'una banda, hem analitzat l'expressió de Neurog3 per tal de determinar si hi ha un augment en el nombre de progenitors endocrins en el pàncrees embrionari dels animals Wnt9a^{-/-}. No obstant, no hem observat diferències significatives en els nivells del mRNA de *Neurog3* entre ambdós genotips Wnt9a^{+/+} i Wnt9a^{-/-} (Figura 52), el que suggereix que no hi ha canvis marcats en l'especificació endocrina en absència de Wnt9a.

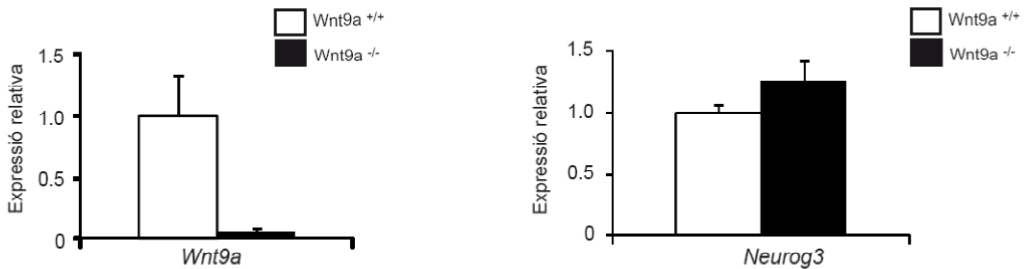


FIGURA 52. Expressió gènica a l'estadi de desenvolupament e15.5 del lligand Wnt9a i del factor pro-endocrí Neurog3. Es va recollir pàncrees embrionari a e15.5 i se'n va extreure RNA total. Els nivells d'expressió dels gens indicats van ser analitzats per qRT-PCR. Els resultats estan expressats en relació a Wnt9a^{+/+} al que se li ha donat el valor de 1. Les barres representen mitjana ± SEM de 8 animals Wnt9a^{+/+} i 7 Wnt9a^{-/-} i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*.

A continuació, hem estudiat l'expressió d'altres factors de transcripció endocrins, activats per sota de Neurog3 (*Pax4*, *Nkx2.2*, *Nkx6.1*, *NeuroD1* i *Pdx1*), per tal d'identificar possibles alteracions en el programa de diferenciació endocrina provocades per la deficiència en Wnt9a. Hem observat diferències significatives en l'expressió gènica de *Nkx2.2* i *Pdx1*, ambdós augmentats en absència del lligand Wnt9a (Figura 53). A e15.5, *Pdx1* s'expressa a totes les cèl·lules epitelials pancreàtiques, però a nivells marcadament més alts a les cèl·lules β que encara estan en procés de diferenciació. De la mateixa manera, *Nkx2.2*, un factor que en estadis primerencs es troba expressat a totes les cèl·lules del primordi pancreàtic, durant la transició secundària queda restringit a les cèl·lules de llinatge endocrí. En canvi, ni *Pax4*, ni *NeuroD1*, ni *Nkx6.1* veuen modificada la seva expressió en absència de Wnt9a.

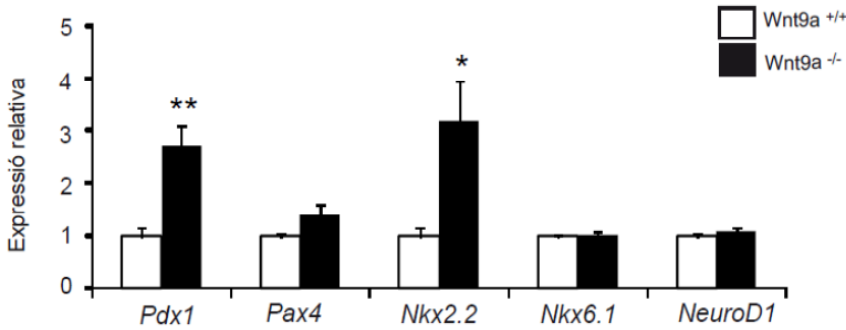


FIGURA 53. Expressió gènica de marcadors endocrins en els animals deficients en *Wnt9a* a l'estadi de desenvolupament e15.5. Es va recollir pàncrees embrionari a e15.5 i se'n va extreure RNA total. Els nivells d'expressió dels gens indicats van ser analitzats per qRT-PCR. Els resultats estan expressats en relació a *Wnt9a*^{+/+}, al que se li ha donat el valor de 1. Les barres representen mitjana±SEM de 8 animals *Wnt9a*^{+/+} i 7 *Wnt9a*^{-/-}; **p*<0.05 i ***p*<0.01 (test estadístic de la t-student). L'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*.

L'estudi de l'expressió gènica de les hormones endocrines majoritàries en aquest estadi de desenvolupament (insulina i glucagó) revela que no hi ha canvis (Figura 54). El fet de no veure un augment en l'expressió d'aquestes hormones pot ser degut a que es tracta d'un estadi molt primerenc en el procés de diferenciació endocrina, i que els canvis no siguin detectables fins més endavant.

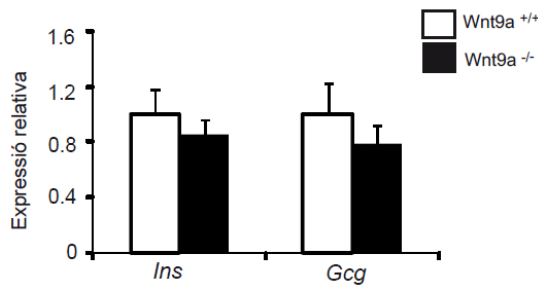


FIGURA 54. Expressió gènica de les hormones endocrines del pàncrees en els animals deficients en *Wnt9a* a l'estadi de desenvolupament e15.5. Es va recollir pàncrees embrionari a e15.5 i se'n va extreure RNA total. Els nivells d'expressió dels gens indicats van ser analitzats per qRT-PCR. Els resultats estan expressats en relació a *Wnt9a*^{+/+} al que se li ha donat el valor de 1. Les barres representen mitjana±SEM de 8 animals *Wnt9a*^{+/+} i 7 *Wnt9a*^{-/-}; i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*.

Hem estudiat també l'expressió de marcadors gènics del compartiment pancreàtic exocrí. En concret, hem determinat els nivells de mRNA del factor bHLH pro-exocrí *Ptf1a* i de l'enzim amilasa (Figura 55). En absència de *Wnt9a* no es veu alterada l'expressió de cap dels dos gens, fet que suggereix que *Wnt9a* no regula la diferenciació del compartiment exocrí del pàncrees en aquest estadi de desenvolupament.

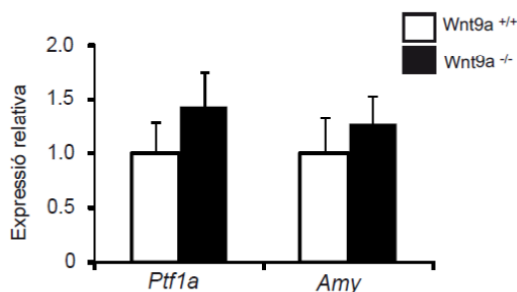


FIGURA 55. Expressió gènica de marcadors exocrins en els animals deficients en *Wnt9a* a l'estadi de desenvolupament e15.5. Es va recollir pàncrees embrionari a e15.5 i se'n va extreure RNA total. Els nivells d'expressió dels gens indicats van ser analitzats per qRT-PCR. Els resultats estan expressats en relació a *Wnt9a*^{+/+} al que se li ha donat el valor de 1. Les barres representen mitjana±SEM de 8 animals *Wnt9a*^{+/+} i 7 *Wnt9a*^{-/-} i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*.

Hem investigat també si la deficiència de *Wnt9a* *in vivo* comporta canvis en els nivells d'expressió de determinats components de la via de senyalització Wnt (Figura 56). En primer lloc, hem estudiat l'expressió dels components de la via Wnt canònica: l'efector de la via *Tcf712* i el modulador, alhora que diana, de la via, *Axin2*. Mentre que no detectem canvis en l'expressió de *Axin2*, observem una disminució significativa dels nivells de *Tcf712* en absència de *Wnt9a*. Aquest darrer resultat aniria en el mateix sentit que els nostres resultats *in vitro* mostrats anteriorment (veure figura 47), on la sobreexpressió de *Wnt9a* provocava l'augment de l'expressió de *Tcf712* a les cèl·lules mPAC.

També, hem analitzat si l'absència de *Wnt9a* dóna com a resposta un augment en l'expressió del seu paràleg *Wnt9b* com a fenomen compensatori. Com s'ha descrit amb anterioritat, l'expressió de *Wnt9b* no es detecta en pàncrees embrionari. Els resultats no mostren un augment en l'expressió d'aquest lligand, que continua sent indetectable en el pàncrees dels animals *Wnt9a*^{-/-} a l'estadi e15.5 (dades no mostrades). Finalment, l'estudi de l'expressió del lligand *Wnt7b* revela que en

absència de *Wnt9a in vivo*, existeix un augment significatiu en l'expressió d'aquest lligand. Aquest resultat suggereix una possible regulació entre lligands de la mateixa via.

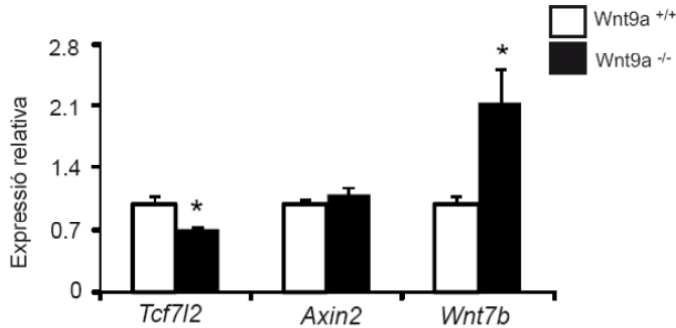


FIGURA 56. Expressió gènica de gens de la via de Wnt en els animals deficients en *Wnt9a* a l'estadi de desenvolupament e15.5. Es va recollir pàncrees embrionari a e15.5 i se'n va extreure RNA total. Els nivells d'expressió dels gens indicats van ser analitzats per qRT-PCR. Els resultats estan expressats en relació a *Wnt9a*^{+/+} al que se li ha donat el valor de 1. Les barres representen mitjana±SEM de 8 animals *Wnt9a*^{+/+} i 7 *Wnt9a*^{-/-} i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*. * $p < 0.05$ (test estadístic de la t-student).

Finalment, hem avaluat l'expressió de components de la via de senyalització Notch: els receptors de la via, *Notch1* i *Notch2*, així com el factor de transcripció bHLH, *Hes1*. Podem veure que, mentre que l'expressió de *Notch1* no es veu afectada per l'absència de *Wnt9a*, observem un augment en l'expressió de *Notch2* i una disminució de *Hes1*, canvis que en cap són significatius.

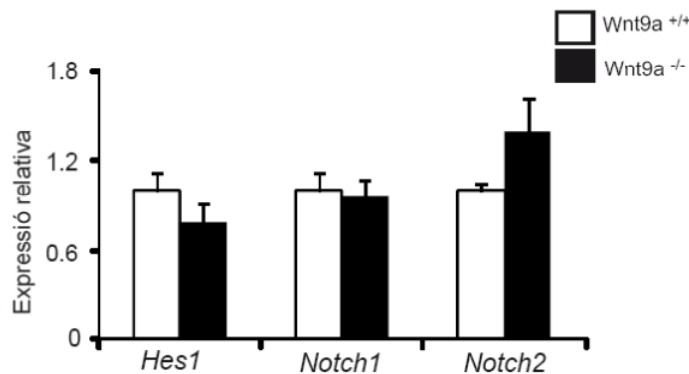


FIGURA 57. Expressió gènica de gens de la via de Notch en els animals deficients en *Wnt9a* a l'estadi de desenvolupament e15.5. Es va recollir pàncrees embrionari a e15.5 i se'n va extreure RNA total. Els nivells d'expressió dels gens indicats van ser analitzats per qRT-PCR. Els resultats estan expressats en relació a *Wnt9a*^{+/+} al que se li ha donat el valor de 1. Les barres representen mitjana±SEM de 8 animals *Wnt9a*^{+/+} i 7 *Wnt9a*^{-/-} i l'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen *TBP*.

3.3.2 ANÀLISI MORFOMÈTRICA DEL PÀNCREES ENDOCRÍ EN ANIMALS WNT9A^{-/-} A L'ESTADI (e)15.5

Els estudis d'expressió gènica realitzats a e15.5 suggereixen que l'absència de *Wnt9a* podria resultar en una major taxa de diferenciació endocrina. Per contra, l'expressió gènica de les hormones endocrines majoritàries en aquest estadi (insulina i glucagó) no canvia. Aquests resultats suggereixen que, els canvis observats en l'expressió de marcadors endocrins encara no s'han traduït en un augment del nombre de cèl·lules endocrines madures, és a dir, que expressin hormones.

Per tal de fer una anàlisi més acurada de les cèl·lules endocrines que en aquest moment estan expressant insulina o glucagó, hem realitzat l'estudi morfològic a aquest estadi. Per una banda, no observem diferències en la distribució i localització de les cèl·lules insulino o glucagó-positives entre ambdós genotips estudiats, *Wnt9a^{+/+}* i *Wnt9a^{-/-}* (Figura 58). I per l'altra, l'anàlisi morfològica dels pàncrees a e15.5 no revela canvis significatius en el nombre de cèl·lules endocrines entre genotips: cèl·lules β insulino-positives (82.66 ± 5.97 ; 74.43 ± 1.44 , essent la mitjana \pm SEM de *Wnt9a^{+/+}* i *Wnt9a^{-/-}*, respectivament), i cèl·lules α glucagó-positives (39.26 ± 6.76 ; 38.10 ± 1.96 , essent la mitjana \pm SEM de *Wnt9a^{+/+}* i *Wnt9a^{-/-}*, respectivament) (Figura 59).

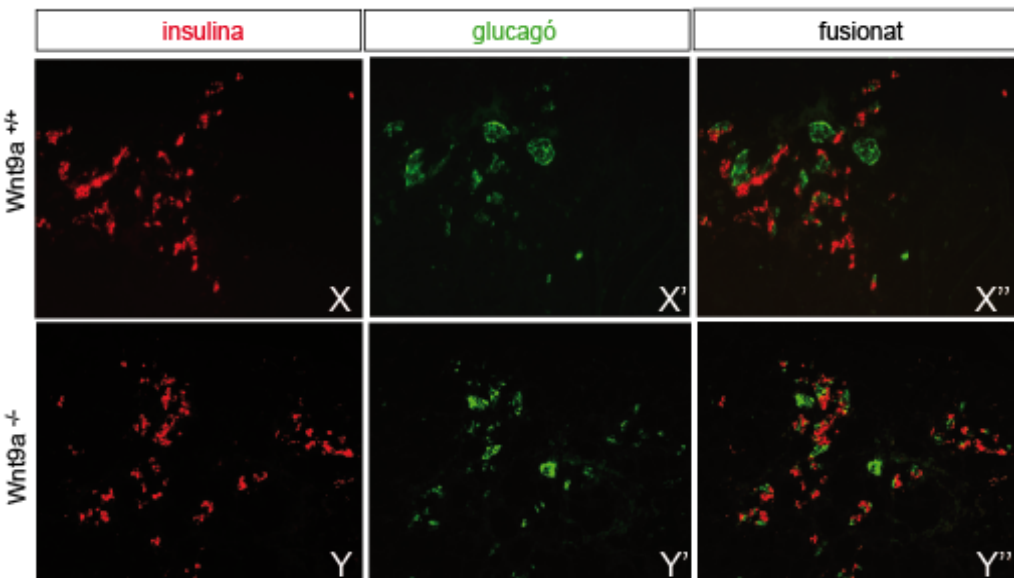


FIGURA 58. Tinció per les hormones pancreàtiques majoritàries a estadi e15.5 dels animals deficients en *Wnt9a*. A dia e15.5 de desenvolupament hem fet extracció del sistema digestiu embrionari, hem fixat i deshidratat i seguidament hem parafinitzat. Hem fet immunofluorescència de les hormones insulina (vermell) i glucagó (verd) per a un animal *Wnt9a^{+/+}* i un animal *Wnt9a^{-/-}*.

Per tant, tot i que observem un augment en l'expressió de marcadors endocrins a l'estadi e15.5, aquest encara no és suficient per detectar un canvi significatiu en el nombre de cèl·lules endocrines.

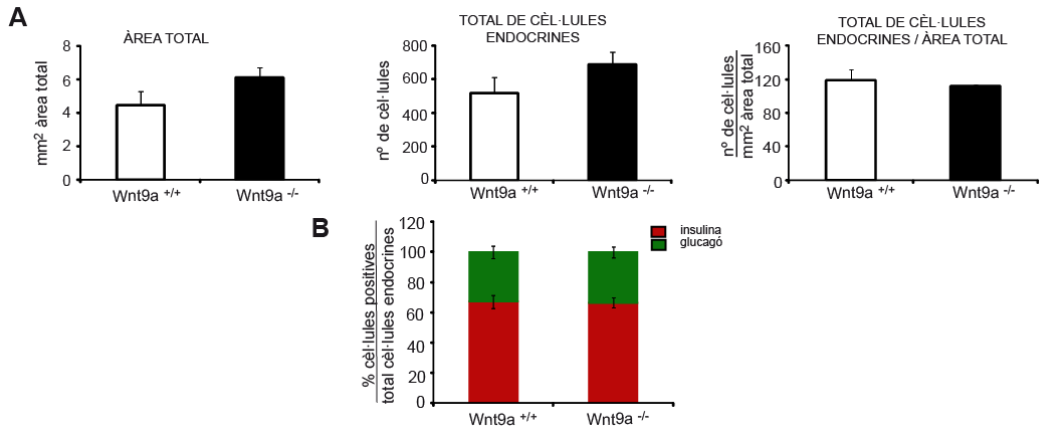


FIGURA 59. Estudi del fenotip dels animals deficients en Wnt9a a l'estadi de desenvolupament e15.5. Hem analitzat com a mínim 10 talls de cada embrió (de 3µm cada un) separats entre ells 90µm (6 animals Wnt9a^{+/+} i 3 animals Wnt9a^{-/-}) i hem representat (A) l'àrea total de pàncrees analitzada, el número total de cèl·lules endocrines (insulina i glucagó) i la relació entre aquests dos paràmetres, i (B) hem representat les cèl·lules endocrines positives per a cada tipus cel·lular respecte del número total de cèl·lules endocrines comptabilitzades. Les barres representen mitjana±SEM i *p<0.05 (test estadístic de la t-student).

3.4. ESTUDI DE LA PROLIFERACIÓ DEL COMPARTIMENT ENDOCRÍ A L'ESTADI (e)18.5

La via de senyalització Wnt s'ha relacionat amb processos de proliferació, i més concretament, el lligand Wnt9a ha estat definit, utilitzant diferents sistemes, com un lligand que participa en proliferació, tal i com s'explica a la introducció. Per altra banda, se sap que en els estadis finals del desenvolupament embrionari (des de e17.5 en endavant), hi ha un augment important de la proliferació de cèl·lules β , que continua en l'etapa post-natal, amb l'objectiu d'establir la massa cel·lular β en l'adult (Georgia et al., 2006). Per aquest motiu, ens hem preguntat si l'augment de cèl·lules endocrines observat al final de la gestació, pot ser també degut a canvis en la taxa proliferativa d'aquestes cèl·lules com a conseqüència de l'absència de Wnt9a.

Amb aquesta finalitat, hem analitzat la taxa de proliferació de les cèl·lules positives per les hormones insulina, glucagó i somatostatina, estudiant la colocalització de cadascuna d'elles amb el marcador de proliferació ki67, proteïna que marca totes les cèl·lules que estan en cicle. Hem estudiat 3 animals per cada genotip ($Wnt9a^{+/+}$ i $Wnt9a^{-/-}$) i hem comptabilitzat com a mínim 500 cèl·lules per animal en el cas de la insulina, 250 cèl·lules per animal en el cas del glucagó i per a la somatostatina un mínim de 150 cèl·lules per animal.

Com es pot apreciar a la figura 60, s'observa un augment significatiu de la proliferació en els animals deficients per a $Wnt9a$ en les cèl·lules β insulino-positives (8.56 ± 1.35 ; 13.04 ± 0.76 , $p < 0.05$, essent la mitjana \pm SEM de $Wnt9a^{+/+}$ i $Wnt9a^{-/-}$, respectivament) i en les cèl·lules δ somatostatina-positives (6.01 ± 0.94 ; 10.11 ± 1.39 , $p < 0.05$, essent la mitjana \pm SEM de $Wnt9a^{+/+}$ i $Wnt9a^{-/-}$, respectivament). En el cas de les cèl·lules α glucagó-positives s'observa una tendència a estar augmentada, però en cap cas aquest augment és significatiu (5.80 ± 2.38 ; 9.47 ± 1.10 , $p = 0.2$, essent la mitjana \pm SEM de $Wnt9a^{+/+}$ i $Wnt9a^{-/-}$, respectivament).

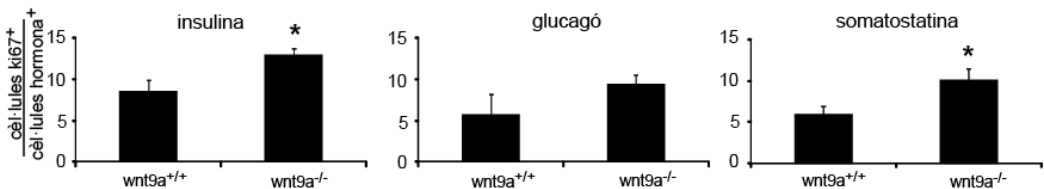


FIGURA 60. Estudi de la proliferació en l'estadi de desenvolupament e18.5. S'ha utilitzat com a marcador de proliferació ki67, i s'han comptabilitzat les cèl·lules que són positives per ki67 i que alhora són marcades per alguna de les tres hormones pancreàtiques indicades. S'han estudiat 3 animals per a cada genotip ($Wnt9a^{+/+}$ i $Wnt9a^{-/-}$). Les barres representen mitjana \pm SEM i * $p < 0.05$ (test estadístic de la t-student).

Aquests resultats ens estarien suggerint que l'augment generalitzat de les cèl·lules del compartiment endocrí que hem observat a e18.5 en els animals $Wnt9a^{-/-}$, pot ser degut, entre d'altres fenòmens, a un augment de la taxa de proliferació en absència del lligand, indicant, per tant, que $Wnt9a$ tindria una funció anti-proliferativa *in vivo*.

3.5. ANÀLISI DEL METABOLISME DE LA GLUCOSA EN ANIMALS WNT9A^{+/-}

Recentment, s'ha publicat un treball en el que es demostra que el tipus de dieta té efectes sobre l'homeòstasi de la glucosa, no només en l'individu en sí, sinó que també sobre la descendència d'aquest (Ng et al., 2010). En aquest treball demostren que la descendència (primera generació) de ratolins mascles alimentats amb una dieta alta en greixos (HFD, High Fat Diet) presenta alteracions en el metabolisme de la glucosa. Fan un estudi genòmic a gran escala, en el qual comparen els illots de la descendència de pares HFD amb els de la descendència de pares alimentats amb dieta estàndard, i observen que de més de 2000 gens expressats diferencialment hi ha gens relacionats amb la via Wnt. De manera interessant, entre aquests gens trobem els lligands Wnt9a i Wnt9b, els quals veuen disminuïda la seva expressió.

En base a aquesta publicació, hem hipotetitzat que els animals heterozigots per al gen *Wnt9a* podrien presentar alteracions en el metabolisme de la glucosa en l'edat adulta. Per avaluar aquesta hipòtesi vam estudiar animals a les 8 setmanes d'edat comparant animals *Wnt9a*^{+/+} i *Wnt9a*^{+/-} (Figura 61). No vam detectar diferències de pes, així com tampoc diferències en els nivells basals de glicèmia després de 5 hores de dejuni. Complementàriament, la realització d'un test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (IPGTT) tampoc va revelar diferències significatives entre ambdós genotips.

Aquests resultats indiquen que l'absència d'aquest lligand en animals que presenten com a mínim una còpia del gen *Wnt9a*, no comporta alteracions en el metabolisme de la glucosa en l'edat adulta en condicions normals.

Seria interessant avaluar si l'haploinsuficiència per aquest lligand pot tenir efectes sobre l'homeostasi de la glucosa en condicions fisiopatològiques, com per exemple podria ser l'obesitat.

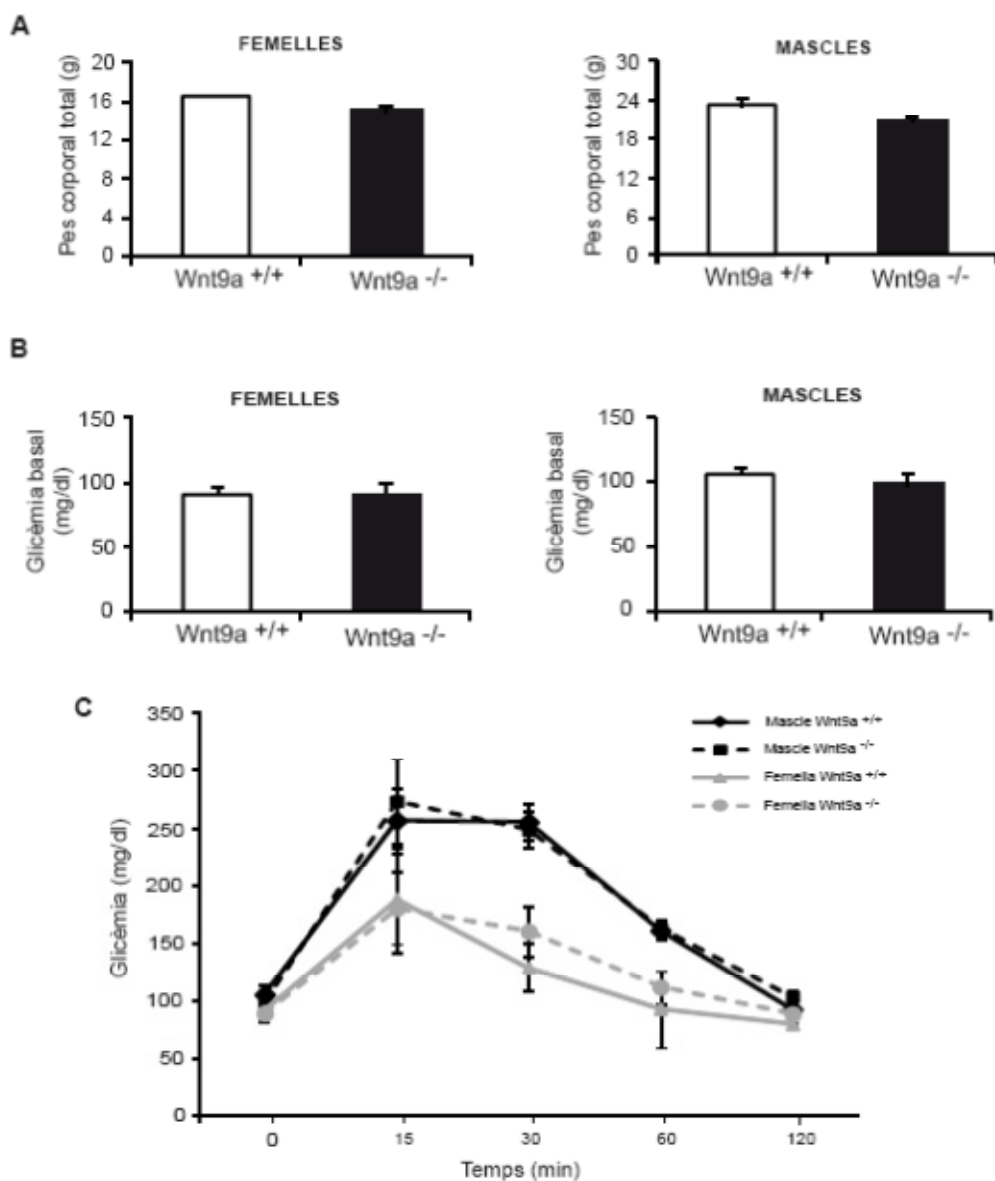


FIGURA 61. Pes corporal, nivells basals de glucosa i test de tolerància a la glucosa en animals *Wnt9a* adults salvatges i heterozigots. Pes corporal (A) i valors de glicèmia basal (B) de 6 animals *Wnt9a*^{+/+} i 12 animals *Wnt9a*^{-/-} a les 8 setmanes d'edat. Els resultats són la mitjana ± SEM i l'estadística va ser analitzada amb el test estadístic de la t-student. (C) Corbes de glicèmia del test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (IPGTT). Els resultats són la mitjana ± SEM de 6 animals *Wnt9a*^{+/+} i 12 animals *Wnt9a*^{-/-} a les 8 setmanes d'edat. L'estadística va ser analitzada amb el test estadístic de la t-student.

V. DISCUSSIÓ

La diabetis mellitus (DM) és un dels problemes de salut més importants del segle actual que afecta tota la població mundial. És una de les principals causes de mort en els països subdesenvolupats, i les complicacions de salut que se'n deriven tenen enormes costos econòmics per a la societat. Actualment la diabetis només es tracta de manera pal·liativa amb l'administració d'insulina exògena de manera periòdica. Tot i els avenços i millores que s'han dut a terme en la insulinoteràpia, els pacients afronten problemes de salut com episodis d'hipo i hiperglucèmies que derivaran més tard en afectacions micro i macrovasculars. Per aquest motiu es fa necessari trobar la clau que obri les portes a una possible cura de la diabetis.

Una de les opcions plantejades més prometedores per a la cura de la malaltia és la medicina regenerativa. Els fonaments d'aquesta disciplina es basen en generar cèl·lules madures de qualitat i en quantitat suficient, per reemplaçar les cèl·lules destruïdes o no funcionals a causa d'una malaltia, que en el cas de la diabetis es tractaria de restablir la massa de cèl·lules β perduda. Una de les aproximacions proposades és generar cèl·lules β a partir de cèl·lules progenitores pancreàtiques o bé de cèl·lules pluripotents provinents d'altres llinatges, però per portar-ho a terme, cal conèixer en detall quins són els processos que ocorren *in vivo* durant l'organogènesi pancreàtica. En aquest sentit, un dels propòsits d'aquesta tesi ha estat aportar coneixements sobre les bases moleculars del programa de diferenciació endocrina del pàncrees.

Els factors de transcripció de la família dels bHLH tenen un paper fonamental en els processos de determinació i diferenciació de diferents teixits, durant el desenvolupament embrionari. En concret, en el pàncrees, Neurog3 és el factor bHLH pro-endocrí que inicia el procés de formació d'aquest llinatge activant la cascada d'un seguit de factors de transcripció que condueixen a la correcta formació de les cèl·lules endocrines del pàncrees. No obstant, els programes de diferenciació no només depenen de la correcta activació de xarxes transcripcionals específiques, sinó que també depenen de senyals extrínsecs regulats per vies de senyalització. Així, sabem que vies com Notch o Wnt, entre d'altres (veure apartat 2.3 de la introducció) juguen papers decisius durant l'embriogènesi pancreàtica. En canvi, es coneix relativament poc sobre com les xarxes transcripcionals i les vies de senyalització es coordinen i regulen mútuament durant els processos de determinació i diferenciació pancreàtica.

En aquesta tesi, hem volgut aprofundir en el possible paper de Neurog3 com a regulador de vies de senyalització durant l'activació del programa de diferenciació endocrina al pàncrees (Figura 62). Fins ara s'ha descrit Neurog3 com el factor que inicia la cascada transcripcional del programa de diferenciació endocrina del pàncrees, però es coneix poc sobre com aquest factor de transcripció interacciona amb les diferents vies de senyalització, esmentades a la introducció, durant aquest procés. Mentre que és ben coneguda la relació que existeix entre Neurog3 i la via de senyalització Notch (Apelqvist et al., 1999), es desconeix el paper que Neurog3 juga en altres vies, com per exemple la via Wnt.

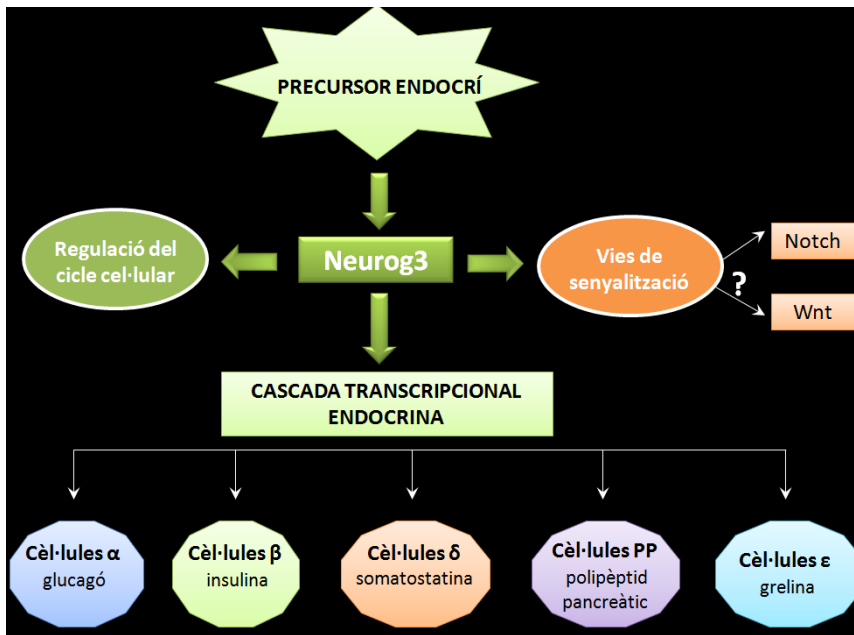


FIGURA 62. Esquema representatiu del procés de diferenciació endocrina on hi intervé Neurog3. Neurog3 inicia el programa transcripcional que porta a la correcta formació de les cèl·lules endocrines del pàncrees, però en aquest procés també hi intervien d'altres com les vies de senyalització o el cicle cel·lular, on Neurog3 pot tenir-hi un paper regulador.

Les implicacions de futur d'aquest estudi són oferir informació que sigui útil a l'hora de buscar diferents estratègies, per a poder imitar *in vitro* el procés que té lloc *in vivo* durant l'organogènesi pancreàtica. El coneixement en detall de la senyalització extrínseca podria oferir la possibilitat per exemple, d'induir la diferenciació de cèl·lules

mare embrionàries cap a cèl·lules pancreàtiques diferenciades afegint simplement petites molècules al medi de cultiu cel·lular (revisat a (Borowiak et al., 2009b)).

LA VIA DE SENYALITZACIÓ WNT PARTICIPA EN EL PROCÉS DE DIFERENCIACIÓ ENDOCRINA DEL PÀNCREES

Estudis genòmics realitzats en el nostre grup, destinats a identificar nous gens diana dels factors de transcripció Neurog3 i Math6 durant el procés de diferenciació endocrina del pàncrees, evidencien una possible regulació d'aquests factors sobre la via Wnt.

Estudis globals d'expressió gènica independents també han suggerit la regulació per part de Neurog3 de components de la via Wnt. Per una banda, un primer estudi *in vitro* en el que utilitzen un model de diferenciació endocrina amb cèl·lules mare (ESC) (Serafimidis, Rakatzi et al. 2008), suggereixen que Neurog3 regula diferents components de la via Wnt. Un altre estudi, en aquest cas *in vivo*, on comparen el perfil d'expressió gènica de pàncrees embrionari, en diferents estadis de desenvolupament, de ratolins Neurog3^{-/-} amb els animals control (Juhl, Sarkar et al. 2008) també identifiquen la via de senyalització Wnt com a diferencialment expressada entre genotips. I finalment, en un altre estudi on utilitzen el model animal Neurog3-GFP (White, May et al. 2008), comparen progenitors pancreàtics Neurog3⁺ i també conclouen que la via Wnt pertany al grup de gens diferencialment expressats en l'estudi. Totes aquestes dades reforcen la hipòtesi inicial d'aquesta tesi. És interessant mencionar que entre aquests estudis i el nostre trobem dianes de Neurog3 compartides, com és el cas del gen Prickle1.

En aquesta tesi demostrem que dos factors de transcripció de la família dels bHLH, Neurog3 i Math6, tenen la capacitat de regular diferents elements relacionats amb la via Wnt, en un context pancreàtic, més concretament durant el procés de diferenciació endocrino-pancreàtica. A part del pàncrees, també s'ha descrit una regulació similar en el treball de Zhang C. i col·laboradors, en el qual es descriu la regulació gènica dels components de la via Wnt, β -catenina i Gsk-3 β , per part dels factors bHLH Mash1, Id2 i Hes1, però en un context de diferenciació neuronal (Zhang et al., 2010).

L'acció de Neurog3 o Math6 sobre els diferents gens relacionats amb la via de Wnt, podria venir donada no únicament per una modulació en l'expressió d'aquests, sinó

per una interacció física i/o funcional d'aquests sobre components de la via, com per exemple β -catenina. En la literatura trobem exemples de factors bHLH que interaccionen de manera directa amb β -catenina. Aquest és el cas del factor promiogènic MyoD de la família dels factors bHLH (Kim et al., 2008). O per exemple, el cas del factor Mitf, de la família de factors bHLH amb cremallera de leucines (*leucine zipper*) (Schepsky et al., 2006), pel qual també s'ha definit una interacció física amb β -catenina. Per aquest motiu, en estudis inicials, vam avaluar si Neurog3 o Math6 interaccionaven directament amb β -catenina, però els resultats obtinguts en les dues línies cel·lulars emprades, mPAC i HEK293, ens indiquen que el més probable és que no sigui així (dades no mostrades).

En el mateix sentit, un altre factor de la via Wnt que s'ha descrit que interacciona amb factors bHLH és l'efector de la via Tcf712. Concretament, existeix un treball recent en el que es descriu la interacció entre Neurog2 i Tcf712, tot i que en un altre context tissular, en cervell (Gohlke et al., 2008), utilitzant tècniques *in silico*. Utilitzant les cèl·lules ductals no hem pogut definir l'existència d'interacció física entre Neurog3 i Tcf712 (dades no mostrades).

De manera interessant, recentment s'ha suggerit que el complex Wnt/ β -catenina-TCF també pot regular de manera directa l'expressió de factors bHLH, en concret demostren com aquesta via pot regular de manera directa l'expressió de Neurog1 unint-se al seu promotor durant la diferenciació neuronal (Hirabayashi et al., 2004), però fins el moment, es desconeix completament com Neurog3 regula o és regulada per la via de senyalització Wnt. En aquest treball veiem que Neurog3 regula negativament l'expressió de Tcf712 tant a nivell de mRNA com de proteïna a les cèl·lules mPAC. Aquest resultat pren importància quan el comparem amb les dades que presenten Pedersen AH. i col·laboradors amb les quals mostren com l'activació de la via Wnt en pollastre, mitjançant la sobreexpressió de la forma constitutivament activa de β -catenina, en cèl·lules que sobreexpressen Neurog3, provoca una disminució en el nombre de cèl·lules endocrines (Pedersen et al., 2005). Per tant, suggereixen que la inhibició de la via Wnt seria necessària per a la formació del compartiment endocrí. No obstant, hem de recordar la funció dual de Tcf712, que actua com a repressor o activador transcripcional depenent del context cel·lular en el que es troba i dels components moleculars que l'acompanyen, tal i com s'ha explicat en la

introducció. Per tant, que Neurog3 reprimeixi l'expressió de Tcf7l2 no es tradueix necessàriament amb una repressió de la via Wnt/ β -catenina, si bé pot significar tot just el contrari.

Cal mencionar la importància del gen Tcf7l2 en pàncrees, ja que variants genètiques associades al gen *TCF7L2* s'han relacionat amb la susceptibilitat de patir diabetis i amb una funció deficient de la cèl·lula β (revisat a (Gloyn et al., 2009)). S'ha descrit per una banda que el bloqueig de l'expressió de Tcf7l2 redueix dràsticament els nivells de secreció d'insulina, tant en illots humans com de ratolí, mentre que la sobreexpressió té l'efecte contrari, estimula la secreció d'insulina (Shu et al., 2008). Però, de manera contrària al que s'esperaria, l'únic estudi en humans que compara l'expressió de TCF7L2 entre illots de pacients diabètics i controls, mostra que els primers presenten un augment en l'expressió de *TCF7L2* a nivell de mRNA (Lyssenko et al., 2007). Recentment, s'ha suggerit però que l'expressió de Tcf7l2 a nivell de mRNA i de proteïna pot anar en sentits oposats, ja que el treball de Shu i col·laboradors mostren que, mentre que els nivells de mRNA en illots diabètics és superior que en illots control, com ja s'havia descrit, els nivells proteics, utilitzant models diabètics diferents, són inferiors (Shu et al., 2009).

Se sap que és important el lloc i el moment en el qual s'estudia l'activació de la via de senyalització Wnt. Això potser ens pot ajudar a explicar un dels problemes que hem tingut a l'estudiar la capacitat d'activació de Neurog3 i Math6 sobre la via Wnt/ β -catenina en les diferents línies cel·lulars utilitzades. Per una banda, en les cèl·lules HEK293 podem definir efectes, contraposats, entre Neurog3 i Math6 a l'hora d'activar la via. Per contra, no observem cap dels efectes esmentats d'aquests dos factors de transcripció sota un context pancreàtic, en les cèl·lules mPAC. Tot i que els resultats obtinguts amb els *arrays* d'expressió, mostren que aquesta línia ductal expressa una àmplia bateria de components de la via de Wnt, el que obtenim són nivells d'activació de la via molt febles. Probablement hi ha algun component clau que aquestes cèl·lules no expressen i que és essencial per a visualitzar nivells elevats d'activació de la via canònica. Per exemple, sabem que les cèl·lules mPAC expressen tots els receptors de la via a excepció de Fzd9 i Fzd10, que no expressen cap dels lligands de la via a excepció de Wnt4 i Wnt7b, o que dels moduladors de la via Dkk, només expressen Dkk1, mentre que dels inhibidors de la via Sfrp no n'expressen cap. El fet de detectar

nivells tan baixos d'activitat de la via Wnt en les cèl·lules mPAC podria correlacionar amb els resultats que presenta el grup de Grappin-Botton A. (Dessimoz et al., 2005). Utilitzant dues línies de ratolí reporteress (Conductin/Axin-LacZ i BAT-Gal) mostren com l'activitat de la via Wnt és activa només en el compartiment endocrí durant el desenvolupament pancreàtic i en el naixement, quedant exclosa dels compartiments acinar i ductal.

IDENTIFICACIÓ DE NOUS COMPONENTS DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ WNT EN PÀNCREES EMBRIONARI DE RATOLÍ

En aquesta tesi definim, en alguns casos per primera vegada, la presència de gens relacionats amb la via de senyalització Wnt en pàncrees embrionari i que han estat identificats com a dianes potencials de Neurog3. En alguns casos també mostrem l'enriquiment de la seva expressió en illots adults de ratolí. En definitiva, l'expressió en pàncrees embrionari d'aquests gens reforça la idea que aquesta via estaria participant en el procés de diferenciació endocrino-pancreàtica.

Fins el moment, els treballs que hi ha publicats al respecte aporten dades molt confuses sobre la participació de la via Wnt en el procés de diferenciació pancreàtica, probablement degut als diferents models animals i cel·lulars emprats (Dessimoz et al., 2005; Murtaugh et al., 2005; Papadopoulou and Edlund, 2005; Heiser et al., 2006; Wells et al., 2007). Els models més emprats són aquells en els quals es manipula l'expressió de β -catenina *in vivo*. Tal i com s'explica a la introducció, β -catenina té una funció dual: una relacionada amb processos d'adhesió cel·lular i l'altra com a component nuclear de la cascada de senyalització Wnt. En els models animals, en els quals s'ha modificat l'expressió de β -catenina de manera condicional en pàncrees, presenten el greu problema de no poder discernir si els efectes observats sobre la diferenciació pancreàtica són deguts al paper de β -catenina sobre l'adhesió cel·lular o al seu paper en la via de senyalització, com molt bé exposa Murtaugh LC (Murtaugh, 2008). A part, s'ha de tenir en compte, que la majoria de models fan ús d'estratègies que afecten l'expressió de β -catenina a la totalitat del pàncrees, utilitzant l'expressió del gen *Pdx1*, iniciant així els seus efectes des de les etapes més inicials de formació pancreàtica.

Tal i com s'explica a la introducció, altres models emprats que manipulen l'expressió d'altres components de la via, deixen entreveure una participació de la via Wnt en el compartiment endocrí del pàncrees (Papadopoulou and Edlund, 2005; Rulifson et al., 2007; Jonckheere et al., 2008). Altra vegada, posem de manifest la importància del context cel·lular en el qual estudiem els efectes de la via Wnt. Per a estudiar en concret la diferenciació pancreàtica, seria molt més adequat l'ús de models més específics per a aquesta etapa i/o d'aquest compartiment en concret. De fet, en el treball de Dabernat i col·laboradors (Dabernat et al., 2009), en el qual delecten l'expressió de β -catenina específicament en cèl·lules β sota el control del promotor d'insulina de rata (RIP), descriuen un fenotip d'afectació en la funcionalitat d'aquestes cèl·lules en l'etapa post-natal. En aquest sentit, el model de diferenciació endocrina que hem emprat per aquesta tesi és un bon model per a estudiar els mecanismes moleculars que intervenen durant la diferenciació endocrina. Hem de tenir en compte, però, que es tracta d'un model cel·lular en el qual sobreexpressem un factor de transcripció.

IDENTIFICACIÓ DEL LLIGAND WNT9A COM A COMPONENT DE LA CASCADA DE DIFERENCIACIÓ ENDOCRINA DEL PÀNCREES

Hem identificat els gens que codifiquen pels lligands Wnt9a i Wnt7b com a possibles dianes de Neurog3 *in vitro*. La identificació d'aquests dos lligands suggereix la possible participació d'aquests en el programa de diferenciació endocrina en el pàncrees. De fet, la presència en pàncrees embrionari d'alguns dels lligands de la via Wnt, entre ells el lligand Wnt7b ja va ser descrita per Heller i els seus col·laboradors (Heller et al., 2002). Per contra, en el cas de Wnt9a, no s'havia identificat la seva expressió a pàncrees embrionari anteriorment.

Definim per primera vegada la relació entre Neurog3 i un component de la via de senyalització Wnt, el lligand Wnt9a. Una relació d'aquest tipus en pàncrees fins ara només havia estat descrita per a la via de senyalització Notch (Apelqvist et al., 1999; Murtaugh et al., 2003). Per una banda, Neurog3 indueix l'expressió del lligand Delta i del receptor Notch2. Per l'altra, el factor bHLH Hes1 reprimeix l'expressió de Neurog3. Recentment, ha estat publicat un treball que suggereix la relació entre la via Notch i el factor de transcripció Nkx6.1 en la formació de l'epiteli pancreàtic primerenc (Afelik et al., 2012). En aquest treball defineixen la unió directa de Rpbjk al promotor de Nkx6.1.

Aquest fet aporta més evidències als recents suggeriments de l'existència d'interrelacions entre les xarxes transcripcionals i els senyals inter i intracel·lulars durant l'embriogènesi pancreàtica, i més concretament en l'especificació i diferenciació dels diferents llinatges cel·lulars presents en el pàncrees adult.

De manera interessant, el gen de *Wnt9a* va ser identificat com a possible diana directa de Neurog/NeuroD en un entorn neuronal mitjançant mètodes bioinformàtics (Seo et al., 2007). En aquest mateix estudi *Wnt7b* també es va identificar com un gen amb caixes E probablement regulat per factors bHLH. En el mateix sentit, en aquesta tesi demostrem com altres factors de la família dels bHLH (NeuroD1, Mash1 i MyoD) tenen la capacitat d'induir l'activació de *Wnt9a* a diferents nivells. Però aquesta característica no és compartida per tots els membres de la família, ja que els factors Ptf1a i Mist1 no regulen l'expressió d'aquest lligand.

La inducció en l'expressió del gen de *Wnt9a* promoguda per Neurog3 no és quelcom específic del model cel·lular mPAC, ja que aquest mateix resultat l'observem també en d'altres línies cel·lulars, no necessàriament pancreàtiques. Aquest fet indica que l'activació de *Wnt9a* per part de Neurog3 no requereix components moleculars que siguin específics de teixit, sinó que aquesta regulació és més general.

Hi ha diferents indicis que ens fan pensar que el lligand Wnt9a es tracta d'una diana directa de Neurog3. Per una banda, els estudis temps-resposta ens indiquen que Wnt9a és regulat per Neurog3 de manera ràpida, característica que comparteix amb Math6, recentment descrit com a diana directa de Neurog3 (Pujadas et al., 2011). Per altra banda, demostrem que Neurog3 indueix canvis epigenètics en el promotor del gen de *Wnt9a*. Però el que determinaria de manera més específica si Wnt9a és una diana directa de Neurog3 és l'estudi de la unió d'aquest factor en el promotor de Wnt9a mitjançant ChIP. De fet, estudis preliminars, indicarien que és així, però queda pendent de corroborar aquestes dades.

Demostrem que elements específics de la cascada de diferenciació endocrina poden regular l'expressió del mRNA de *Wnt9a* (com NeuroD1, Nkx6.1 i Pax4). Aquests resultats fan que puguem hipotetitzar sobre la possible implicació de la via Wnt en la xarxa transcripcional endocrina. Aquestes dades, juntament amb el fet que, els factors de transcripció pro-exocrins *Ptf1a* i *Mist1* no tinguin la capacitat de regular

l'expressió de *Wnt9a* recolza encara més que aquest lligand podria estar intervenint específicament en el programa de diferenciació endocrina. En paral·lel, l'anàlisi del promotor de *Wnt9a* amb el software de Genomatix ens ha permès identificar elements d'unió a factors bHLH, específicament llocs d'unió a NeuroD1, així com també a factors endocrino-pancreàtics com Pax4/6 o Nkx6.1. Els nostres resultats en les cèl·lules mPAC estarien indicant que aquests llocs d'unió serien funcionals.

En aquesta tesi descrivim per primera vegada la presència del mRNA del lligand Wnt9a en pàncrees embrionari i en illots aïllats de pàncrees neonatal i adult, pas essencial per a seguir estudiant el possible rol d'aquest lligand en el desenvolupament pancreàtic. Observem també una major expressió d'aquest lligand en les línies cel·lulars endocrines (α TC1.6, β TC3 i Min6) en relació amb l'expressió en les línies acino-ductals (266 i mPAC), indicant que aquest lligand podria estar enriquit en el llinatge endocrí pancreàtic. En el moment d'inici dels nostres estudis, només s'havia descrit el paper de *Wnt9a* durant el procés de condrogènesi i unions cartilaginoses (Spater et al., 2006) i en desenvolupament cardíac (Person et al., 2005). En aquests darrers anys, també s'ha descrit la participació d'aquest lligand en l'organogènesi hepàtica (Matsumoto et al., 2008) i en el desenvolupament neural, en retina (Mizukami et al., 2009).

Un aspecte clau que no hem pogut solucionar, és la identificació de les cèl·lules que estan expressant *Wnt9a* en pàncrees embrionari. De fet, podem apreciar que els nivells d'expressió gènica d'aquest lligand són molt baixos, tant en teixit pancreàtic, com en els altres teixits analitzats per RT-PCR, fet que pot explicar les dificultats que hem tingut a l'hora d'estudiar la localització de *Wnt9a*, tant per colorimetria per tinció x-Gal amb l'ús del model animal *Wnt9a-LacZ*, com per immunohistoquímica amb un anticòs específic per al reporter de la β -galactosidasa. En el mateix sentit, les imatges d'hibridació *in situ* disponibles a la base de dades del GenePaint evidencien un senyal dèbil que podria estar relacionat amb els baixos nivells d'expressió d'aquest lligand a l'embrió.

PAPER DE WNT9A EN EL PROGRAMA DE DIFERENCIACIÓ ENDOCRINO-PANCREÀTICA

Per tal d'esbrinar el rol de Wnt9a dins el procés de diferenciació del llinatge endocrí del pàncrees vam utilitzar aproximacions *in vitro* i *in vivo*.

Per una banda, la sobreexpressió de Wnt9a en el model cel·lular de diferenciació endocrina utilitzat ens suggereix que aquest lligand està exercint una regulació negativa dels efectes de Neurog3, contrarestant els efectes inductors de Neurog3 sobre alguns dels gens de la cascada de diferenciació endocrina. Això va portar a plantejar-nos si bloquejant l'expressió de Wnt9a, mitjançant l'ús de siRNA específics per a Wnt9a, aconseguíem un augment dels efectes inductors de Neurog3. Però les limitacions experimentals degudes a una poca eficiència de bloqueig en l'expressió de Wnt9a, no van permetre concloure aquests estudis.

Per als estudis *in vivo* del paper d'aquest lligand, vam utilitzar el model de ratolí gen anul·lat global de Wnt9a, ja que el model *floxetat* encara no ha estat generat. Tot i la letalitat primerenca dels animals Wnt9a^{-/-}, aquest model és suficient per a poder avaluar el rol de Wnt9a durant el procés de diferenciació endocrina del pàncrees.

Els animals Wnt9a^{-/-} en el moment del naixement (P1) són hipoglucèmics i, en conseqüència, hipoinsulinèmics. L'anàlisi del contingut d'insulina pancreàtica a P1, revela que aquesta hipoinsulinèmia no és deguda a una absència d'aquesta hormona al pàncrees.

Amb l'objectiu de determinar un possible fenotip pancreàtic es va realitzar una caracterització més en profunditat de l'òrgan a diferents estadis del desenvolupament embrionari. L'estudi morfològic a l'estadi e18.5 revela un augment general en el nombre total de cèl·lules endocrines respecte de l'àrea total de pàncrees en absència de Wnt9a, sense mostrar cap evidència de canvis en la distribució dels diferents llinatges endocrins. Aquest increment és significatiu en el cas de la insulina i la somatostatina, però no del glucagó. Aquest resultat estaria indicant que Wnt9a exerceix un efecte negatiu generalitzat sobre la massa endocrina del pàncrees.

Aquests canvis observats ens van portar a analitzar el pàncrees a l'estadi embrionari e15.5, moment en el qual es dona la màxima expansió del compartiment

endocrí, transició secundària, i que coincideix amb els nivells màxims d'expressió proteica de Neurog3 (Schwitzgebel et al., 2000). Tot i que en aquest estadi no s'aprecien encara canvis evidents en el nombre total de cèl·lules endocrines, sí que es poden observar canvis en el perfil d'expressió gènica de diferents components del programa transcripcional endocrí. Observem un augment significatiu de l'expressió de *Pdx1* i *Nkx2.2* en absència de *Wnt9a*. De fet, *Nkx2.2* és un regulador de *Pdx1*, ja que s'ha demostrat que *Nkx2.2* s'uneix al promotor de *Pdx1*, tot i que no s'ha corroborat que el reguli a nivell transcripcional (Van Velkinburgh et al., 2005). Per altra banda, no observem diferències significatives en l'expressió de *Pax4*, *Nkx6.1* o *NeuroD1* en els animals *Wnt9a*^{-/-}, tot i que apreciem un lleuger augment (~40%) en el cas del mRNA *Pax4*. Ara caldrà corroborar aquestes anàlisis d'expressió gènica amb tècniques immunohistoquímiques, que ens permetran determinar si aquests canvis són deguts a un major nombre de cèl·lules que expressen aquests factors, o a una major expressió d'aquestes proteïnes per cèl·lula. En aquest sentit, hem de tenir en compte que alguns d'aquests factors, concretament *Nkx6.1*, amb el qual no detectem diferències a nivell de mRNA, tenen una clara regulació post-transcripcional (Watada et al., 2000).

En base als resultats anteriors, vam hipotetitzar que l'absència de *Wnt9a* podria estar afectant el nombre de progenitors endocrins. No obstant, no hem observat diferències significatives d'expressió de Neurog3 a nivell de mRNA que ens indiquin que aquest sigui el cas, tot i que s'intueix un petit augment (~25%) en els animals *Wnt9a*^{-/-}. No podem descartar però un increment en l'expressió proteica de Neurog3, ja que s'ha descrit una possible regulació post-transcripcional de Neurog3. Ha estat descrita una diferència entre els nivells d'expressió del mRNA i de proteïna, observant que no totes les cèl·lules on es detecta mRNA de Neurog3 estan expressant també la proteïna (Villasenor et al., 2008). Per altra banda, en pàncrees neonatal no es detecten cèl·lules positives per Neurog3 a nivell proteic, però sí que es detecten transcrits de Neurog3 (Joglekar et al., 2007). En aquest sentit, s'ha identificat un conjunt de microRNA específics per a Neurog3, que l'estarien regulant post-transcripcionalment, i que estan sobreexpressats després d'una pancreatectomia parcial i el pàncrees està en un procés de regeneració (Joglekar et al., 2007). A més, cal puntualitzar que hi ha un desfasament temporal entre els pics d'expressió del mRNA i de la proteïna de Neurog3 al pàncrees embrionari. Mentre que el primer es detecta a estadi e14.5, el pic màxim d'expressió proteica es detecta a e15.5, moment

en el que estem realitzant els nostres estudis. Per tant, en base als resultats obtinguts fins el moment, no podem descartar efectes de *Wnt9a* sobre el nombre de cèl·lules Neurog3⁺.

PAPER DE WNT9A EN LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

Està extensament establert que la via de senyalització Wnt es relaciona amb processos de proliferació cel·lular. Per altra banda, se sap que en els estadis finals del desenvolupament embrionari (des de e17.5 en endavant), hi ha un augment important de la proliferació de cèl·lules β , que continua en l'etapa post-natal (Bouwens et al., 2005; Georgia and Bhushan, 2006). De fet, els nostres estudis preliminars d'expressió pancreàtica del lligand *Wnt9a*, ens van mostrar que els nivells del mRNA de *Wnt9a* durant els períodes neonatals de més proliferació (P13 i P21) són baixos, mentre que aquests augmenten a partir de P21, que és quan disminueix la taxa proliferativa de la massa cel·lular β en estadi neonatal.

Per aquests motius vam avaluar si l'absència d'aquest lligand, a més d'estimular la diferenciació endocrina, podia alterar també la taxa replicativa de les cèl·lules endocrines ja diferenciades contribuint a l'augment observat del compartiment endocrí a e18.5. D'acord amb aquest raonament, hem observat un augment del marcador de proliferació ki67 en els tres tipus cel·lulars hormonals estudiats a e18.5, essent altra vegada significatiu en el cas de les cèl·lules positives per insulina i per somatostatina, i no en el cas del glucagó, de la mateixa manera que passa amb l'augment en el nombre de cèl·lules. Serà interessant corroborar aquestes dades en un estadi més primerenc de desenvolupament, mirant per una banda si hi ha una major expansió de les cèl·lules endocrines que expressen hormona, i per l'altra estudiant si hi ha una major expansió de progenitors endocrins.

Aquests resultats estarien assenyalant *Wnt9a* com un lligand anti-proliferatiu *in vivo*, fet que podria explicar l'activació de l'expressió d'aquest lligand promoguda per Neurog3 en el context endocrino-pancreàtic, ja que les cèl·lules que comencen a expressar Neurog3 estarien marcades per a diferenciar-se i no per a proliferar (Miyatsuka et al., 2011). Per tant, les dades que hem obtingut fins al moment lligarien *Wnt9a* amb el control de la proliferació cel·lular, però en sentit oposat al descrit per altres grups, que descriuen un paper proliferatiu d'aquest lligand. Els resultats diversos

però, es poden explicar com a conseqüència dels diferents contextos cel·lulars en els que ha estat descrita aquesta funció proliferativa del lligand (Person et al., 2005; Matsumoto et al., 2008; Xiang et al., 2008).

Els resultats obtinguts en aquesta tesi en el model genanul·lat global de Wnt9a, despertem l'interès per la realització d'estudis futurs en un model animal que tingui delectat el gen *Wnt9a* de manera específica en pàncrees, per exemple sota el control del promotor de *Pdx-1* per eliminar l'expressió de Wnt9a en tot l'òrgan. Això ens permetria veure si l'absència pancreàtica-específica d'aquest lligand condiona la viabilitat d'aquests animals, i si no és així, estudiar com es comporten els canvis en la massa endocrina a l'estadi e18.5, observats en el model gen anul·lat complet, i quina repercussió tenen en l'etapa adulta.

ÉS WNT9A UN ACTIVADOR DE LA VIA CANÒNICA WNT EN PÀNCREES EMBRIONARI?

Wnt9a ha estat descrit com a lligand regulador de la via canònica per diversos grups (Guo et al., 2004; Person et al., 2005; Spater et al., 2006; Matsumoto et al., 2008) en diferents models cel·lulars. De la mateixa manera, en la línia cel·lular mPAC podem observar una capacitat moderada, però significativa, d'aquest lligand a l'hora d'activar la via canònica Wnt/ β -catenina *in vitro*.

En paral·lel, hem observat que el lligand Wnt9a incrementa els nivells proteics de Tcf712 *in vitro*. Aquest augment seria compatible amb el fet que Wnt9a actua com a activador de la via canònica de Wnt en aquest context cel·lular, tot i que, com hem mencionat anteriorment, nivells elevats de Tcf712 no correlacionen directament amb una activació de la via. En el mateix sentit, els estudis d'expressió gènica realitzats en el model animal genanul·lat per Wnt9a, mostren com l'expressió de Tcf712 disminueix en els animals deficients per Wnt9a, indicant que aquest lligand regula positivament els nivells de Tcf712 també *in vivo*. És interessant mencionar que en un treball recent es suggereix una regulació negativa del factor Tcf712 sobre l'expressió del factor de transcripció *Nkx2.2* en el context cel·lular neural, durant la formació del tub neural (Lei et al., 2006), demostrant que el promotor de *Nkx2.2* té llocs d'unió per a Tcf712. Aquests resultats els podríem relacionar amb els nostres estudis en els quals l'absència de Wnt9a *in vivo* disminueix l'expressió de Tcf712, al contrari del que passa

amb Nkx2.2, indicant que també pot existir la regulació negativa de Tcf7l2 sobre Nkx2.2 descrita en un context neuronal, en desenvolupament pancreàtic. S'hauria de verificar però aquesta hipòtesi amb estudis complementaris.

Un altre dels gens de la via Wnt que veu afectada la seva expressió en els animals Wnt9a^{-/-} és el lligand Wnt7b. Aquest s'indueix en absència de Wnt9a. És interessant recordar que justament aquests dos lligands són regulats per Neurog3, i que ho fa de manera oposada. Per tant, prendria sentit que si Neurog3 indueix l'expressió de Wnt9a i reprimeix la de Wnt7b, Wnt9a estigués disminuint l'expressió de Wnt7b, tal i com observem amb el model animal.

Un altre dels gens de la via Wnt analitzats va ser la diana i modulador de la via Wnt/ β -catenina, Axin2, en el qual no s'observen canvis d'expressió en absència de Wnt9a. Aquest resultat fa hipotetitzar que el més probable sigui que els efectes que Wnt9a exerceix en la organogènesi pancreàtica no estiguin mediat per una activació de la via canònica de Wnt. No descartem que Wnt9a pugui estar regulant vies no canòniques de Wnt, quelcom que no hem pogut estudiar en profunditat. Per altra banda, se sap que la via de senyalització Wnt interacciona amb altres vies en processos de decisió de destí cel·lular, i una amb la que ho fa de manera més recurrent és amb la via de senyalització Notch (revisat a (Hayward et al., 2008)). Sembla ser que en "decisiones de destí binàries" Wnt i Notch interaccionen de manera oposada i compensatòria per a que la cèl·lula adquireixi un fenotip o un altre (Hayward et al., 2008). Aquesta regulació és compartida en diferents teixits, per exemple, un article recent, proposa la cooperació entre les vies de senyalització Wnt i Notch en la diferenciació hematopoètica. Aquest treball descriu la regulació entre components d'ambdós vies per la correcta diferenciació de les cèl·lules dendrítiques a partir de cèl·lules hematopoètiques progenitores (Zhou et al., 2009). La via de senyalització Notch seria un bon candidat a ser regulat per Wnt9a per la importància d'aquesta via durant el procés d'especificació endocrina i la seva interconnexió amb Neurog3 (Apelqvist et al., 1999). De fet, amb els estudis d'expressió gènica realitzats en els animals Wnt9a^{-/-} a l'estadi e15.5 hem observat una disminució moderada del factor bHLH de la via, Hes1, i un increment de l'expressió del receptor Notch2 en absència de Wnt9a, el que ens podria estar indicant una regulació de la via Notch mediada pel lligand de la via Wnt. Un article recent que exemplificaria aquesta relació seria un

estudi en peix zebra, en el que demostren que el lligand de la via Wnt, Wnt16, intervé en l'especificació de les cèl·lules mare hematopoètiques (HSCs, *Hematopoietic stem cells*). Observen com Wnt16 no exerceix els seus efectes ni mitjançant la via canònica de Wnt, ni tampoc les no canòniques, sinó que ho fa regulant l'expressió dels lligands de la via Notch: Dlc (Delta C) i Dld (Delta D) (Clements et al., 2011). Experiments futurs amb el model animal de Wnt9a aniran encaminats a esbrinar si Wnt9a pot ser un regulador de la via Notch, i si és a través d'aquesta via que exerceix els seus efectes sobre l'especificació endocrina del pàncrees.

VI. RESUM I CONCLUSIONS

1. Els factors de transcripció bHLH Neurog3 i Math6 regulen l'expressió de components i de gens relacionats amb la via de senyalització Wnt en el model de les cèl·lules mPAC.

2. Els gens identificats com a dianes potencials de Neurog3 i/o Math6 a les cèl·lules mPAC s'expressen en el pàncrees embrionari durant les etapes de diferenciació endocrina, el que suggereix la seva possible participació en el procés de formació del pàncrees endocrí.

3. Neurog3 regula l'expressió del lligand Wnt9a *in vitro*, alhora que aquest lligand és regulat també per altres factors de la cascada transcripcional de diferenciació endocrina, però no per factors de transcripció específicament exocrins.

4. Wnt9a actua com a regulador negatiu dels efectes promoguts per Neurog3 sobre el programa transcripcional endocrí en les cèl·lules mPAC.

5. La deficiència de Wnt9a *in vivo* resulta en un augment generalitzat del compartiment endocrí del pàncrees dels animals Wnt9a^{-/-} en les etapes finals de desenvolupament pancreàtic (e18.5).

6. L'absència de Wnt9a *in vivo* promou un augment de la diferenciació endocrina, evidenciat per l'augment significatiu en l'expressió dels gens dels factors de transcripció endocrins Nkx2.2 i Pdx1 durant la transició secundària (e15.5). No podem descartar, de moment, un possible augment dels progenitors pancreàtics.

7. L'absència Wnt9a resulta en l'augment de proliferació de les cèl·lules endocrines en etapes finals del desenvolupament pancreàtic (e18.5).

8. Wnt9a regula l'expressió del factor efector de la via Wnt, Tcf712. Aquesta regulació s'observa tan en models cel·lulars com *in vivo* en el model murí gen anul·lat per Wnt9a.

Per tant, amb aquests resultats podem concloure que:

1. Existeix una relació entre la via de senyalització Wnt i la cascada transcripcional endocrina del pàncrees, quelcom que succeeix, com a mínim, a nivell del factor pro-endocrí Neurog3, factor que regula l'expressió de gens relacionats amb aquesta via de senyalització.
2. El lligand Wnt9a, identificat com a diana de Neurog3 *in vitro*, intervé en el programa de diferenciació endocrina del pàncrees. El model gen anul·lat per aquest lligand demostra que actua com a regulador negatiu en la formació del pàncrees endocrí possiblement a dos nivells:
 - un de més primerenc, com a regulador negatiu de l'activació del programa de diferenciació endocrina en progenitors pancreàtics,
 - i un de més tardà, en el que exerciria efectes anti-proliferatius, específicament sobre les cèl·lules endocrines ja diferenciades.

VII. BIBLIOGRAFIA

A

Afelik, S., Qu, X., Hasrouni, E., Bukys, M. A., Deering, T., Nieuwoudt, S., Rogers, W., Macdonald, R. J. and Jensen, J. (2012) **'Notch-mediated patterning and cell fate allocation of pancreatic progenitor cells'**, *Development*.

Ahlgren, U., Jonsson, J. and Edlund, H. (1996) **'The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice'**, *Development* 122(5): 1409-16.

Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U. and Edlund, H. (1999) **'Notch signalling controls pancreatic cell differentiation'**, *Nature* 400(6747): 877-81.

Ashery-Padan, R., Zhou, X., Marquardt, T., Herrera, P., Toube, L., Berry, A. and Gruss, P. (2004) **'Conditional inactivation of Pax6 in the pancreas causes early onset of diabetes'**, *Dev Biol* 269(2): 479-88.

B

Barker, N. and Clevers, H. (2006) **'Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics'**, *Nat Rev Drug Discov* 5(12): 997-1014.

Bernardi, H., Gay, S., Fedon, Y., Vernus, B., Bonnieu, A. and Bacou, F. (2011) **'Wnt4 activates the canonical beta-catenin pathway and regulates negatively myostatin: functional implication in myogenesis'**, *Am J Physiol Cell Physiol* 300(5): C1122-38.

Bernstein, B. E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Huebert, D. J., McMahon, S., Karlsson, E. K., Kulbokas, E. J., 3rd, Gingeras, T. R. et al. (2005) **'Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse'**, *Cell* 120(2): 169-81.

Bienz, M. and Clevers, H. (2000) **'Linking colorectal cancer to Wnt signaling'**, *Cell* 103(2): 311-20.

Bonal, C. and Herrera, P. L. (2008) **'Genes controlling pancreas ontogeny'**, *Int J Dev Biol* 52(7): 823-35.

Borowiak, M., Maehr, R., Chen, S., Chen, A. E., Tang, W., Fox, J. L., Schreiber, S. L. and Melton, D. A. (2009a) **'Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells'**, *Cell Stem Cell* 4(4): 348-58.

Borowiak, M. and Melton, D. A. (2009b) **'How to make beta cells?'**, *Curr Opin Cell Biol* 21(6): 727-32.

Bouwens, L. and Rومان, I. (2005) **'Regulation of pancreatic beta-cell mass'**, *Physiol Rev* 85(4): 1255-70.

Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F. and Kirchner, T. (1999) **'beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer'**, *Am J Pathol* 155(4): 1033-8.

Burlison, J. S., Long, Q., Fujitani, Y., Wright, C. V. and Magnuson, M. A. (2008) **'Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells'**, *Dev Biol* 316(1): 74-86.

C

Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P. O. and Caicedo, A. (2006) **'The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2334-9.

Cauchi, S., El Achhab, Y., Choquet, H., Dina, C., Krempler, F., Weitgasser, R., Nejjari, C., Patsch, W., Chikri, M., Meyre, D. et al. (2007) **'TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis'**, *J Mol Med (Berl)* 85(7): 777-82.

Clark, A. (2004) **Morphology of the pancreas in normal and diabetic states**. in F. E. DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P (ed.) *International Textbook of Diabetes Mellitus*, vol. one. England.

Clements, W. K., Kim, A. D., Ong, K. G., Moore, J. C., Lawson, N. D. and Traver, D. (2011) **'A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells'**, *Nature* 474(7350): 220-4.

Columbus, J., Chiang, Y., Shao, W., Zhang, N., Wang, D., Gaisano, H. Y., Wang, Q., Irwin, D. M. and Jin, T. (2010) **'Insulin treatment and high-fat diet feeding reduces the expression of three Tcf genes in rodent pancreas'**, *J Endocrinol* 207(1): 77-86.

Collombat, P., Hecksher-Sorensen, J., Krull, J., Berger, J., Riedel, D., Herrera, P. L., Serup, P. and Mansouri, A. (2007) **'Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression'**, *J Clin Invest* 117(4): 961-70.

Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sorensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G. and Gruss, P. (2003) **'Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development'**, *Genes Dev* 17(20): 2591-603.

Cox, A. A., Jezewski, P. A., Fang, P. K. and Payne-Ferreira, T. L. (2010) **'Zebrafish Wnt9a,9b paralog comparisons suggest ancestral roles for Wnt9 in neural, oral-pharyngeal ectoderm and mesendoderm'**, *Gene Expr Patterns* 10(6): 251-8.

Curtin, E., Hickey, G., Kamel, G., Davidson, A. J. and Liao, E. C. (2011) **'Zebrafish wnt9a is expressed in pharyngeal ectoderm and is required for palate and lower jaw development'**, *Mech Dev* 128(1-2): 104-15.

Chien, A. J., Conrad, W. H. and Moon, R. T. (2009) **'A Wnt survival guide: from flies to human disease'**, *J Invest Dermatol* 129(7): 1614-27.

D

D'Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., Moorman, M. A., Kroon, E., Carpenter, M. K. and Baetge, E. E. (2006) **'Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells'**, *Nat Biotechnol* 24(11): 1392-401.

Dabernat, S., Secret, P., Peuchant, E., Moreau-Gaudry, F., Dubus, P. and Sarvetnick, N. (2009) **'Lack of beta-catenin in early life induces abnormal glucose homeostasis in mice'**, *Diabetologia* 52(8): 1608-17.

Dessimoz, J., Bonnard, C., Huelsken, J. and Grapin-Botton, A. (2005) **'Pancreas-specific deletion of beta-catenin reveals Wnt-dependent and Wnt-independent functions during development'**, *Curr Biol* 15(18): 1677-83.

Dessimoz, J. and Grapin-Botton, A. (2006) **'Pancreas development and cancer: Wnt/beta-catenin at issue'**, *Cell Cycle* 5(1): 7-10.

Dierick, H. and Bejsovec, A. (1999) **'Cellular mechanisms of wingless/Wnt signal transduction'**, *Curr Top Dev Biol* 43: 153-90.

Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I. and Melton, D. A. (2004) **'Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation'**, *Nature* 429(6987): 41-6.

Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. and Moon, R. T. (1995) **'Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in Xenopus embryos'**, *Mol Cell Biol* 15(5): 2625-34.

F

Fujikura, J., Hosoda, K., Iwakura, H., Tomita, T., Noguchi, M., Masuzaki, H., Tanigaki, K., Yabe, D., Honjo, T. and Nakao, K. (2006) **'Notch/Rbp-j signaling prevents premature endocrine and ductal cell differentiation in the pancreas'**, *Cell Metab* 3(1): 59-65.

Fujino, T., Asaba, H., Kang, M. J., Ikeda, Y., Sone, H., Takada, S., Kim, D. H., Ioka, R. X., Ono, M., Tomoyori, H. et al. (2003) **'Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 229-34.

G

Gasa, R. (2005) **'Transcriptional control of pancreatic endocrine cell development'**, *Drug News Perspect* 18(9): 567-76.

Gasa, R., Mrejen, C., Leachman, N., Otten, M., Barnes, M., Wang, J., Chakrabarti, S., Mirmira, R. and German, M. (2004) **'Proendocrine genes coordinate the pancreatic islet differentiation program in vitro'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(36): 13245-50.

Gasa, R., Mrejen, C., Lynn, F. C., Skewes-Cox, P., Sanchez, L., Yang, K. Y., Lin, C. H., Gomis, R. and German, M. S. (2008) **'Induction of pancreatic islet cell differentiation by the neurogenin-neuroD cascade'**, *Differentiation* 76(4): 381-91.

Gasa, R. and Skoudy, A. (2010) **'Transcriptional control of pancreatic development: bHLH factors at the crossroads of exocrine and endocrine specification and differentiation'**, *Trends in Developmental Biology* 5: 29-49.

Georgia, S. and Bhushan, A. (2006) **'p27 Regulates the transition of beta-cells from quiescence to proliferation'**, *Diabetes* 55(11): 2950-6.

Gittes, G. K. (2009) **'Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review'**, *Dev Biol* 326(1): 4-35.

Glick, E., Leshkowitz, D. and Walker, M. D. (2000) **'Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter'**, *J Biol Chem* 275(3): 2199-204.

Gloyn, A. L., Braun, M. and Rorsman, P. (2009) **'Type 2 diabetes susceptibility gene TCF7L2 and its role in beta-cell function'**, *Diabetes* 58(4): 800-2.

Gohlke, J. M., Armant, O., Parham, F. M., Smith, M. V., Zimmer, C., Castro, D. S., Nguyen, L., Parker, J. S., Gradwohl, G., Portier, C. J. et al. (2008) **'Characterization of the proneural gene regulatory network during mouse telencephalon development'**, *BMC Biol* 6: 15.

Golosow, N. and Grobstein, C. (1962) **'Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis'**, *Dev Biol* 4: 242-55.

Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. and Guillemot, F. (2000) **'neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4): 1607-11.

Grapin-Botton, A. (2005) **'Ductal cells of the pancreas'**, *Int J Biochem Cell Biol* 37(3): 504-10.

Gu, G., Dubauskaite, J. and Melton, D. A. (2002) **'Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors'**, *Development* 129(10): 2447-57.

Gumbiner, B. M. (1995) **'Signal transduction of beta-catenin'**, *Curr Opin Cell Biol* 7(5): 634-40.

Guo, T. and Hebrok, M. (2009) **'Stem cells to pancreatic beta-cells: new sources for diabetes cell therapy'**, *Endocr Rev* 30(3): 214-27.

Guo, X., Day, T. F., Jiang, X., Garrett-Beal, L., Topol, L. and Yang, Y. (2004) **'Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation'**, *Genes Dev* 18(19): 2404-17.

H

Habener, J. F., Kemp, D. M. and Thomas, M. K. (2005) **'Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development'**, *Endocrinology* 146(3): 1025-34.

Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K. and Kemler, R. (1995) **'Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation'**, *Development* 121(11): 3529-37.

Harmon, E. B., Apelqvist, A. A., Smart, N. G., Gu, X., Osborne, D. H. and Kim, S. K. (2004) **'GDF11 modulates NGN3+ islet progenitor cell number and promotes beta-cell differentiation in pancreas development'**, *Development* 131(24): 6163-74.

Harrison, K. A., Thaler, J., Pfaff, S. L., Gu, H. and Kehrl, J. H. (1999) **'Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice'**, *Nat Genet* 23(1): 71-5.

Hayward, P., Kalmar, T. and Arias, A. M. (2008) **'Wnt/Notch signalling and information processing during development'**, *Development* 135(3): 411-24.

He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1998) **'Identification of c-MYC as a target of the APC pathway'**, *Science* 281(5382): 1509-12.

Hebrok, M., Kim, S. K., St Jacques, B., McMahon, A. P. and Melton, D. A. (2000) **'Regulation of pancreas development by hedgehog signaling'**, *Development* 127(22): 4905-13.

Hedge, T. A. and Mason, I. (2008) **'Expression of Shisa2, a modulator of both Wnt and Fgf signaling, in the chick embryo'**, *Int J Dev Biol* 52(1): 81-5.

Heiser, P. W., Cano, D. A., Landsman, L., Kim, G. E., Kench, J. G., Klimstra, D. S., Taketo, M. M., Biankin, A. V. and Hebrok, M. (2008) **'Stabilization of beta-catenin induces pancreas tumor formation'**, *Gastroenterology* 135(4): 1288-300.

Heiser, P. W., Lau, J., Taketo, M. M., Herrera, P. L. and Hebrok, M. (2006) **'Stabilization of beta-catenin impacts pancreas growth'**, *Development* 133(10): 2023-32.

Heller, R. S., Dichmann, D. S., Jensen, J., Miller, C., Wong, G., Madsen, O. D. and Serup, P. (2002) **'Expression patterns of Wnts, Frizzleds, sFRPs, and misexpression in transgenic mice suggesting a role for Wnts in pancreas and foregut pattern formation'**, *Dev Dyn* 225(3): 260-70.

Heller, R. S., Klein, T., Ling, Z., Heimberg, H., Katoh, M., Madsen, O. D. and Serup, P. (2003) **'Expression of Wnt, Frizzled, sFRP, and DKK genes in adult human pancreas'**, *Gene Expr* 11(3-4): 141-7.

Henseleit, K. D., Nelson, S. B., Kuhlbrodt, K., Hennings, J. C., Ericson, J. and Sander, M. (2005) **'NKX6 transcription factor activity is required for alpha- and beta-cell development in the pancreas'**, *Development* 132(13): 3139-49.

Heremans, Y., Van De Casteele, M., in't Veld, P., Gradwohl, G., Serup, P., Madsen, O., Pipeleers, D. and Heimberg, H. (2002) **'Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3'**, *J Cell Biol* 159(2): 303-12.

Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004) **'The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells'**, *Development* 131(12): 2791-801.

Hoffman, B. G., Zavaglia, B., Witzsche, J., Ruiz de Algora, T., Beach, M., Hoodless, P. A., Jones, S. J., Marra, M. A. and Helgason, C. D. (2008) **'Identification of transcripts with enriched expression in the developing and adult pancreas'**, *Genome Biol* 9(6): R99.

Holt, S. J. and Sadler, P. W. (1958) **'Studies in enzyme cytochemistry. III. Relationships between solubility, molecular association and structure in indigoid dyes'**, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 148(933): 495-505.

Huang, H. P., Liu, M., El-Hodiri, H. M., Chu, K., Jamrich, M. and Tsai, M. J. (2000) **'Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3'**, *Mol Cell Biol* 20(9): 3292-307.

Hurlstone, A. and Clevers, H. (2002) **'T-cell factors: turn-ons and turn-offs'**, *EMBO J* 21(10): 2303-11.

I

Imamura, M. and Maeda, S. (2011) **'Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives [Review]'**, *Endocr J* 58(9): 723-39.

Inoue, C., Bae, S. K., Takatsuka, K., Inoue, T., Bessho, Y. and Kageyama, R. (2001) **'Math6, a bHLH gene expressed in the developing nervous system, regulates neuronal versus glial differentiation'**, *Genes Cells* 6(11): 977-86.

J

Jenny, M., Uhl, C., Roche, C., Duluc, I., Guillermin, V., Guillemot, F., Jensen, J., Kedingner, M. and Gradwohl, G. (2002) **'Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium'**, *EMBO J* 21(23): 6338-47.

Jensen, J. (2004) **'Gene regulatory factors in pancreatic development'**, *Dev Dyn* 229(1): 176-200.

Jensen, J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P. and Madsen, O. D. (2000) **'Control of endodermal endocrine development by Hes-1'**, *Nat Genet* 24(1): 36-44.

Joglekar, M. V., Parekh, V. S., Mehta, S., Bhonde, R. R. and Hardikar, A. A. (2007) **'MicroRNA profiling of developing and regenerating pancreas reveal post-transcriptional regulation of neurogenin3'**, *Dev Biol* 311(2): 603-12.

Johansson, K. A., Dursun, U., Jordan, N., Gu, G., Beermann, F., Gradwohl, G. and Grapin-Botton, A. (2007) **'Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types'**, *Dev Cell* 12(3): 457-65.

Jonckheere, N., Mayes, E., Shih, H. P., Li, B., Lioubinski, O., Dai, X. and Sander, M. (2008) **'Analysis of mPygo2 mutant mice suggests a requirement for mesenchymal Wnt signaling in pancreatic growth and differentiation'**, *Dev Biol* 318(2): 224-35.

Jones, S. (2004) **'An overview of the basic helix-loop-helix proteins'**, *Genome Biol* 5(6): 226.

Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T. and Edlund, H. (1994) **'Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice'**, *Nature* 371(6498): 606-9.

K

Kawano, Y. and Kypta, R. (2003) **'Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway'**, *J Cell Sci* 116(Pt 13): 2627-34.

Kemler, R. (1993) **'From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion'**, *Trends Genet* 9(9): 317-21.

Kestler, H. A. and Kuhl, M. (2008) **'From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network'**, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363(1495): 1333-47.

Kim, C. H., Neiswender, H., Baik, E. J., Xiong, W. C. and Mei, L. (2008) **'Beta-catenin interacts with MyoD and regulates its transcription activity'**, *Mol Cell Biol* 28(9): 2941-51.

Kim, S. K. and Melton, D. A. (1998) **'Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 13036-41.

Knip, M., Veijola, R., Virtanen, S. M., Hyoty, H., Vaarala, O. and Akerblom, H. K. (2005) **'Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes'**, *Diabetes* 54 Suppl 2: S125-36.

Koyama, E., Shibukawa, Y., Nagayama, M., Sugito, H., Young, B., Yuasa, T., Okabe, T., Ochiai, T., Kamiya, N., Rountree, R. B. et al. (2008) **'A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis'**, *Dev Biol* 316(1): 62-73.

Krapp, A., Knofler, M., Ledermann, B., Burki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbuchle, O. and Wellauer, P. K. (1998) **'The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas'**, *Genes Dev* 12(23): 3752-63.

Kubo, F. and Nakagawa, S. (2010) **'Cath6, a bHLH atonal family proneural gene, negatively regulates neuronal differentiation in the retina'**, *Dev Dyn* 239(9): 2492-500.

L

Landsman, L., Nijagal, A., Whitchurch, T. J., Vanderlaan, R. L., Zimmer, W. E., Mackenzie, T. C. and Hebrok, M. (2011) **'Pancreatic Mesenchyme Regulates Epithelial Organogenesis throughout Development'**, *PLoS Biol* 9(9): e1001143.

Lee, C. S., De Leon, D. D., Kaestner, K. H. and Stoffers, D. A. (2006) **'Regeneration of pancreatic islets after partial pancreatectomy in mice does not involve the reactivation of neurogenin-3'**, *Diabetes* 55(2): 269-72.

Lei, Q., Jeong, Y., Misra, K., Li, S., Zelman, A. K., Epstein, D. J. and Matise, M. P. (2006) **'Wnt signaling inhibitors regulate the transcriptional response to morphogenetic Shh-Gli signaling in the neural tube'**, *Dev Cell* 11(3): 325-37.

Lewis, J. (1998) **'Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates'**, *Semin Cell Dev Biol* 9(6): 583-9.

Li, H., Arber, S., Jessell, T. M. and Edlund, H. (1999) **'Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9'**, *Nat Genet* 23(1): 67-70.

Lin, Z., Gao, C., Ning, Y., He, X., Wu, W. and Chen, Y. G. (2008) **'The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/beta-catenin signaling'**, *J Biol Chem* 283(48): 33053-8.

Loder, M. K., da Silva Xavier, G., McDonald, A. and Rutter, G. A. (2008) **'TCF7L2 controls insulin gene expression and insulin secretion in mature pancreatic beta-cells'**, *Biochem Soc Trans* 36(Pt 3): 357-9.

Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P. M., Birchmeier, W. et al. (2002) **'Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors'**, *Mol Cell Biol* 22(4): 1184-93.

Lynn, F. C., Sanchez, L., Gomis, R., German, M. S. and Gasa, R. (2008) **'Identification of the bHLH factor Math6 as a novel component of the embryonic pancreas transcriptional network'**, *PLoS One* 3(6): e2430.

Lynn, F. C., Smith, S. B., Wilson, M. E., Yang, K. Y., Nekrep, N. and German, M. S. (2007) **'Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25): 10500-5.

Lyssenko, V., Lupi, R., Marchetti, P., Del Guerra, S., Orho-Melander, M., Almgren, P., Sjogren, M., Ling, C., Eriksson, K. F., Lethagen, A. L. et al. (2007) **'Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes'**, *J Clin Invest* 117(8): 2155-63.

M

Macfarlane, W. M., Campbell, S. C., Elrick, L. J., Oates, V., Bermano, G., Lindley, K. J., Aynsley-Green, A., Dunne, M. J., James, R. F. and Docherty, K. (2000) **'Glucose regulates islet amyloid polypeptide gene transcription in a PDX1- and calcium-dependent manner'**, *J Biol Chem* 275(20): 15330-5.

Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M. L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W. F., Moyer, M. P., Riecken, E. O., Buhr, H. J. et al. (1999) **'Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1603-8.

Maretto, S., Cordenonsi, M., Dupont, S., Braghetta, P., Broccoli, V., Hassan, A. B., Volpin, D., Bressan, G. M. and Piccolo, S. (2003) **'Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6): 3299-304.

Massari, M. E. and Murre, C. (2000) **'Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms'**, *Mol Cell Biol* 20(2): 429-40.

Matsumoto, K., Miki, R., Nakayama, M., Tatsumi, N. and Yokouchi, Y. (2008) **'Wnt9a secreted from the walls of hepatic sinusoids is essential for morphogenesis, proliferation, and glycogen accumulation of chick hepatic epithelium'**, *Dev Biol* 319(2): 234-47.

McLin, V. A., Rankin, S. A. and Zorn, A. M. (2007) **'Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development'**, *Development* 134(12): 2207-17.

Mii, Y. and Taira, M. (2011) **'Secreted Wnt "inhibitors" are not just inhibitors: regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins'**, *Dev Growth Differ* 53(8): 911-23.

Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T. K., Koche, R. P. et al. (2007) **'Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells'**, *Nature* 448(7153): 553-60.

Miller, C. P., McGehee, R. E., Jr. and Habener, J. F. (1994) **'IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene'**, *EMBO J* 13(5): 1145-56.

Miller, J. R. (2002) **'The Wnts'**, *Genome Biol* 3(1): REVIEWS3001.

Miyatsuka, T., Kosaka, Y., Kim, H. and German, M. S. (2011) **'Neurogenin3 inhibits proliferation in endocrine progenitors by inducing Cdkn1a'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(1): 185-90.

Mizukami, M., Souchelnytskyi, N., Kiuchi, Y. and Kanamoto, T. (2009) **'Wnt14 inhibits death of retinal precursor cells'**, *Exp Eye Res* 89(4): 462-8.

Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B. et al. (1989) **'Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence'**, *Cell* 58(3): 537-44.

Murtaugh, L. C. (2008) **'The what, where, when and how of Wnt/beta-catenin signaling in pancreas development'**, *Organogenesis* 4(2): 81-6.

Murtaugh, L. C., Law, A. C., Dor, Y. and Melton, D. A. (2005) **'Beta-catenin is essential for pancreatic acinar but not islet development'**, *Development* 132(21): 4663-74.

Murtaugh, L. C., Stanger, B. Z., Kwan, K. M. and Melton, D. A. (2003) **'Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 14920-5.

N

Nadauld, L. D., Sandoval, I. T., Chidester, S., Yost, H. J. and Jones, D. A. (2004) **'Adenomatous polyposis coli control of retinoic acid biosynthesis is critical for zebrafish intestinal development and differentiation'**, *J Biol Chem* 279(49): 51581-9.

Naya, F. J., Huang, H. P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F. J., Leiter, A. B. and Tsai, M. J. (1997) **'Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice'**, *Genes Dev* 11(18): 2323-34.

Nelson, S. B., Schaffer, A. E. and Sander, M. (2007) **'The transcription factors Nkx6.1 and Nkx6.2 possess equivalent activities in promoting beta-cell fate specification in Pdx1+ pancreatic progenitor cells'**, *Development* 134(13): 2491-500.

Ng, S. F., Lin, R. C., Laybutt, D. R., Barres, R., Owens, J. A. and Morris, M. J. (2010) **'Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring'**, *Nature* 467(7318): 963-6.

Niehrs, C. (2006) **'Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators'**, *Oncogene* 25(57): 7469-81.

Nusse, R. and Varmus, H. E. (1992) **'Wnt genes'**, *Cell* 69(7): 1073-87.

O

Ohlsson, H., Karlsson, K. and Edlund, T. (1993) **'IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene'**, *EMBO J* 12(11): 4251-9.

Oliver-Krasinski, J. M. and Stoffers, D. A. (2008) **'On the origin of the beta cell'**, *Genes Dev* 22(15): 1998-2021.

Orci, L., Baetens, D., Ravazzola, M., Stefan, Y. and Malaisse-Lagae, F. (1976) **'Pancreatic polypeptide and glucagon : non-random distribution in pancreatic islets'**, *Life Sci* 19(12): 1811-5.

P

Papadopoulou, S. and Edlund, H. (2005) **'Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not pancreatic function'**, *Diabetes* 54(10): 2844-51.

Paronen, J. and Eisenbarth, G. S. (2004) **Immunopathogenesis of Type 1 Diabetes in Western Society**. in DeFronzo RA Ferranini E Keen H and Z. P (eds.) *International Textbook of Diabetes Mellitus*, vol. one. England.

Pedersen, A. H. and Heller, R. S. (2005) **'A possible role for the canonical Wnt pathway in endocrine cell development in chicks'**, *Biochem Biophys Res Commun* 333(3): 961-8.

Person, A. D., Garriock, R. J., Krieg, P. A., Runyan, R. B. and Klewer, S. E. (2005) **'Frzb modulates Wnt-9a-mediated beta-catenin signaling during avian atrioventricular cardiac cushion development'**, *Dev Biol* 278(1): 35-48.

Prado, C. L., Pugh-Bernard, A. E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B. and Sussel, L. (2004) **'Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2924-9.

Pujadas, G., Felipe, F., Ejarque, M., Sanchez, L., Cervantes, S., Lynn, F. C., Gomis, R. and Gasa, R. (2011) **'Sequence and epigenetic determinants in the regulation of the Math6 gene by Neurogenin3'**, *Differentiation* 82(2): 66-76.

R

Rajagopal, J., Carroll, T. J., Guseh, J. S., Bores, S. A., Blank, L. J., Anderson, W. J., Yu, J., Zhou, Q., McMahon, A. P. and Melton, D. A. (2008) **'Wnt7b stimulates embryonic lung growth by coordinately increasing the replication of epithelium and mesenchyme'**, *Development* 135(9): 1625-34.

Rohrs, S., Kutzner, N., Vlad, A., Grunwald, T., Ziegler, S. and Muller, O. (2009) **'Chronological expression of Wnt target genes Ccnd1, Myc, Cdkn1a, Tfrc, Pif1 and Ramp3'**, *Cell Biol Int* 33(4): 501-8.

Rorsman, P. and Renstrom, E. (2003) **'Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells'**, *Diabetologia* 46(8): 1029-45.

Ross, M. D., Martinka, S., Mukherjee, A., Sedor, J. R., Vinson, C. and Bruggeman, L. A. (2006) **'Math6 expression during kidney development and altered expression in a mouse model of glomerulosclerosis'**, *Dev Dyn* 235(11): 3102-9.

Rukstalis, J. M. and Habener, J. F. (2009) '**Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration**', *Islets* 1(3): 177-84.

Rulifson, I. C., Karnik, S. K., Heiser, P. W., ten Berge, D., Chen, H., Gu, X., Taketo, M. M., Nusse, R., Hebrok, M. and Kim, S. K. (2007) '**Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation**', *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(15): 6247-52.

S

Salonen, J. T., Uimari, P., Aalto, J. M., Pirskanen, M., Kaikkonen, J., Todorova, B., Hypponen, J., Korhonen, V. P., Asikainen, J., Devine, C. et al. (2007) '**Type 2 diabetes whole-genome association study in four populations: the DiaGen consortium**', *Am J Hum Genet* 81(2): 338-45.

Sander, M., Sussel, L., Connors, J., Scheel, D., Kalamaras, J., Dela Cruz, F., Schwitzgebel, V., Hayes-Jordan, A. and German, M. (2000) '**Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas**', *Development* 127(24): 5533-40.

Schaffer, A. E., Freude, K. K., Nelson, S. B. and Sander, M. (2010) '**Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors**', *Dev Cell* 18(6): 1022-9.

Schepsky, A., Bruser, K., Gunnarsson, G. J., Goodall, J., Hallsson, J. H., Goding, C. R., Steingrimsson, E. and Hecht, A. (2006) '**The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression**', *Mol Cell Biol* 26(23): 8914-27.

Schwitzgebel, V. M., Scheel, D. W., Connors, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D. J., Sussel, L., Johnson, J. D. and German, M. S. (2000) '**Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas**', *Development* 127(16): 3533-42.

Sekiya, T., Adachi, S., Kohu, K., Yamada, T., Higuchi, O., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Nakamura, T., Tashiro, K., Kuhara, S. et al. (2004) '**Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells**', *J Biol Chem* 279(8): 6840-6.

Sellick, G. S., Barker, K. T., Stolte-Dijkstra, I., Fleischmann, C., Coleman, R. J., Garrett, C., Gloyne, A. L., Edghill, E. L., Hattersley, A. T., Wellauer, P. K. et al. (2004) '**Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis**', *Nat Genet* 36(12): 1301-5.

Seo, S., Lim, J. W., Yellajoshiyula, D., Chang, L. W. and Kroll, K. L. (2007) '**Neurogenin and NeuroD direct transcriptional targets and their regulatory enhancers**', *EMBO J* 26(24): 5093-108.

Serafimidis, I., Rakatzi, I., Episkopou, V., Gouti, M. and Gavalas, A. (2008) '**Novel effectors of directed and Ngn3-mediated differentiation of mouse embryonic stem cells into endocrine pancreas progenitors**', *Stem Cells* 26(1): 3-16.

Servitja, J. M. and Ferrer, J. (2004) '**Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function**', *Diabetologia* 47(4): 597-613.

Seymour, P. A., Freude, K. K., Tran, M. N., Mayes, E. E., Jensen, J., Kist, R., Scherer, G. and Sander, M. (2007) **'SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(6): 1865-70.

Seymour, P. A. and Sander, M. (2011) **'Historical perspective: beginnings of the beta-cell: current perspectives in beta-cell development'**, *Diabetes* 60(2): 364-76.

Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M. and Rajotte, R. V. (2000) **'Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen'**, *N Engl J Med* 343(4): 230-8.

Sharma, R. P. and Chopra, V. L. (1976) **'Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in Drosophila melanogaster'**, *Dev Biol* 48(2): 461-5.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1995) **'Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases'**, *Genes Dev* 9(10): 1149-63.

Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. and Ben-Ze'ev, A. (1999) **'The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway'**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10): 5522-7.

Shu, L., Matveyenko, A. V., Kerr-Conte, J., Cho, J. H., McIntosh, C. H. and Maedler, K. (2009) **'Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function'**, *Hum Mol Genet* 18(13): 2388-99.

Shu, L., Sauter, N. S., Schulthess, F. T., Matveyenko, A. V., Oberholzer, J. and Maedler, K. (2008) **'Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets'**, *Diabetes* 57(3): 645-53.

Shu, W., Jiang, Y. Q., Lu, M. M. and Morrissey, E. E. (2002) **'Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung'**, *Development* 129(20): 4831-42.

Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., Boutin, P., Vincent, D., Belisle, A., Hadjadj, S. et al. (2007) **'A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes'**, *Nature* 445(7130): 881-5.

Smith, S. B., Ee, H. C., Connors, J. R. and German, M. S. (1999) **'Paired-homeodomain transcription factor PAX4 acts as a transcriptional repressor in early pancreatic development'**, *Mol Cell Biol* 19(12): 8272-80.

Smith, S. B., Gasa, R., Watada, H., Wang, J., Griffen, S. C. and German, M. S. (2003) **'Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4'**, *J Biol Chem* 278(40): 38254-9.

Smith, S. B., Watada, H., Scheel, D. W., Mrejen, C. and German, M. S. (2000) **'Autoregulation and maturity onset diabetes of the young transcription factors control the human PAX4 promoter'**, *J Biol Chem* 275(47): 36910-9.

Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G. and Gruss, P. (1997) **'The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas'**, *Nature* 386(6623): 399-402.

Spater, D., Hill, T. P., O'Sullivan R, J., Gruber, M., Conner, D. A. and Hartmann, C. (2006) **'Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis'**, *Development* 133(15): 3039-49.

Stevens, J. D., Roalson, E. H. and Skinner, M. K. (2008) **'Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation'**, *Differentiation* 76(9): 1006-22.

Stoffers, D. A., Zinkin, N. T., Stanojevic, V., Clarke, W. L. and Habener, J. F. (1997) **'Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence'**, *Nat Genet* 15(1): 106-10.

Sun, X. Y., Hayashi, Y., Xu, S., Kanou, Y., Takagishi, Y., Tang, Y. P. and Murata, Y. (2011) **'Inactivation of the Rcan2 gene in mice ameliorates the age- and diet-induced obesity by causing a reduction in food intake'**, *PLoS One* 6(1): e14605.

Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D. J., Meneses, J. J., Pedersen, R. A., Rubenstein, J. L. and German, M. S. (1998) **'Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells'**, *Development* 125(12): 2213-21.

T

Tao, Q., Yokota, C., Puck, H., Kofron, M., Birsoy, B., Yan, D., Asashima, M., Wylie, C. C., Lin, X. and Heasman, J. (2005) **'Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in Xenopus embryos'**, *Cell* 120(6): 857-71.

Tetsu, O. and McCormick, F. (1999) **'Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells'**, *Nature* 398(6726): 422-6.

U

Ueno, K., Hirata, H., Majid, S., Tabatabai, Z., Hinoda, Y. and Dahiya, R. (2011) **'IGFBP-4 activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway and induces M-CAM expression in human renal cell carcinoma'**, *Int J Cancer*.

V

van Amerongen, R. and Berns, A. (2006) **'Knockout mouse models to study Wnt signal transduction'**, *Trends Genet* 22(12): 678-89.

Van de Wetering, M., Castrop, J., Korinek, V. and Clevers, H. (1996) **'Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties'**, *Mol Cell Biol* 16(3): 745-52.

van Noort, M. and Clevers, H. (2002) **'TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer'**, *Dev Biol* 244(1): 1-8.

Van Velkinburgh, J. C., Samaras, S. E., Gerrish, K., Artner, I. and Stein, R. (2005) **'Interactions between areas I and II direct pdx-1 expression specifically to islet cell types of the mature and developing pancreas'**, *J Biol Chem* 280(46): 38438-44.

Villasenor, A., Chong, D. C. and Cleaver, O. (2008) '**Biphasic Ngn3 expression in the developing pancreas**', *Dev Dyn* 237(11): 3270-9.

W

Waeber, G., Thompson, N., Nicod, P. and Bonny, C. (1996) '**Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor**', *Mol Endocrinol* 10(11): 1327-34.

Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. and Stillman, B. (1994) '**The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA**', *Nature* 369(6481): 574-8.

Wang, S., Jensen, J. N., Seymour, P. A., Hsu, W., Dor, Y., Sander, M., Magnuson, M. A., Serup, P. and Gu, G. (2009) '**Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function**', *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(24): 9715-20.

Wang, S., Yan, J., Anderson, D. A., Xu, Y., Kanal, M. C., Cao, Z., Wright, C. V. and Gu, G. (2010) '**Neurog3 gene dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas**', *Dev Biol* 339(1): 26-37.

Wang, Z., Shu, W., Lu, M. M. and Morrisey, E. E. (2005) '**Wnt7b activates canonical signaling in epithelial and vascular smooth muscle cells through interactions with Fzd1, Fzd10, and LRP5**', *Mol Cell Biol* 25(12): 5022-30.

Watada, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., Hanafusa, T., Hamaguchi, K., Matsuoka, T., Yamamoto, K., Matsuzawa, Y., Kawamori, R. and Yamasaki, Y. (1996a) '**PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in alphaTC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin**', *Diabetes* 45(12): 1826-31.

Watada, H., Kajimoto, Y., Umayahara, Y., Matsuoka, T., Kaneto, H., Fujitani, Y., Kamada, T., Kawamori, R. and Yamasaki, Y. (1996b) '**The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells**', *Diabetes* 45(11): 1478-88.

Watada, H., Mirmira, R. G., Leung, J. and German, M. S. (2000) '**Transcriptional and translational regulation of beta-cell differentiation factor Nkx6.1**', *J Biol Chem* 275(44): 34224-30.

Wells, J. M., Esni, F., Boivin, G. P., Aronow, B. J., Stuart, W., Combs, C., Sklenka, A., Leach, S. D. and Lowy, A. M. (2007) '**Wnt/beta-catenin signaling is required for development of the exocrine pancreas**', *BMC Dev Biol* 7: 4.

Wierup, N., Yang, S., McEvelly, R. J., Mulder, H. and Sundler, F. (2004) '**Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells**', *J Histochem Cytochem* 52(3): 301-10.

www.genepaint.org/Frameset.html.

www.idf.org.

www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/.

X

Xiang, Y., Lin, G., Zhang, Q., Tan, Y. and Lu, G. (2008) **'Knocking down Wnt9a mRNA levels increases cellular proliferation'**, *Mol Biol Rep* 35(2): 73-9.

Xu, X., D'Hoker, J., Stange, G., Bonne, S., De Leu, N., Xiao, X., Van de Casteele, M., Mellitzer, G., Ling, Z., Pipeleers, D. et al. (2008) **'Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas'**, *Cell* 132(2): 197-207.

Y

Yao, J., Zhou, J., Liu, Q., Lu, D., Wang, L., Qiao, X. and Jia, W. (2010) **'Atoh8, a bHLH transcription factor, is required for the development of retina and skeletal muscle in zebrafish'**, *PLoS One* 5(6): e10945.

Yechoor, V. and Chan, L. (2010) **'Minireview: beta-cell replacement therapy for diabetes in the 21st century: manipulation of cell fate by directed differentiation'**, *Mol Endocrinol* 24(8): 1501-11.

Yechoor, V., Liu, V., Espiritu, C., Paul, A., Oka, K., Kojima, H. and Chan, L. (2009) **'Neurogenin3 is sufficient for transdetermination of hepatic progenitor cells into neo-islets in vivo but not transdifferentiation of hepatocytes'**, *Dev Cell* 16(3): 358-73.

Yi, F., Brubaker, P. L. and Jin, T. (2005) **'TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta'**, *J Biol Chem* 280(2): 1457-64.

Z

Zaret, K. S. and Grompe, M. (2008) **'Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas'**, *Science* 322(5907): 1490-4.

Zhang, C., Zhang, Z., Shu, H., Liu, S., Song, Y., Qiu, K. and Yang, H. (2010) **'The modulatory effects of bHLH transcription factors with the Wnt/beta-catenin pathway on differentiation of neural progenitor cells derived from neonatal mouse anterior subventricular zone'**, *Brain Res* 1315: 1-10.

Zhou, J., Cheng, P., Youn, J. I., Cotter, M. J. and Gaborilovich, D. I. (2009) **'Notch and wntless signaling cooperate in regulation of dendritic cell differentiation'**, *Immunity* 30(6): 845-59.

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J. and Melton, D. A. (2008) **'In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells'**, *Nature* 455(7213): 627-32.

Zhu, S., Wurdak, H., Wang, J., Lyssiotis, C. A., Peters, E. C., Cho, C. Y., Wu, X. and Schultz, P. G. (2009) **'A small molecule primes embryonic stem cells for differentiation'**, *Cell Stem Cell* 4(5): 416-26.

Zhu, W., Shiojima, I., Ito, Y., Li, Z., Ikeda, H., Yoshida, M., Naito, A. T., Nishi, J., Ueno, H., Umezawa, A. et al. (2008) **'IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis'**, *Nature* 454(7202): 345-9.

ANNEX

Llistat d'anticossos utilitzats

ANTICÓS PRIMARI	ORGANISME	APLICACIÓ	DILUCIÓ	CASA COMERCIAL	REFERÈNCIA
anti- β -catenina activa	ratolí	<i>western blot</i>	1/1000	Millipore	05-665
beta-actina	conill	<i>western blot</i>	1/1000	Sigma-Aldrich	A-2066
HA	ratolí	<i>western blot</i>	1/1000	Sigma-Aldrich	H-9658
anti-Tcf7l2	conill	<i>western blot</i>	1/5000	Abcam	ab76151
myc	ratolí	immunofluorescència	1/100	Millipore	05-419
ins	conillet d'índies	immunofluorescència	1/1000	DAKO	A0564
gcg	ratolí	immunofluorescència	1/1000	Sigma-Aldrich	G-2654
gcg	conill	immunofluorescència	1/1000	DAKO	A0565
sst	conill	immunofluorescència	1/500	DAKO	A0566
ki67	ratolí	immunofluorescència	1/50	BD Pharmigen™	556027
beta-galactosidase	conill	immunofluorescència	1/100	Cappel	55976
IgG	conill	ChIP	1/3000	Sigma-Aldrich	A0-418
H3K4me2	conill	ChIP	1/3000	Millipore	07-030
H3K4me3	conill	ChIP	1/3000	Millipore	04-473
H3K27me3	conill	ChIP	1/3000	Millipore	07-449

ANTICÓS SECUNDARI	APLICACIÓ	DILUCIÓ	CASA COMERCIAL	REFERÈNCIA
Anti-mouse IgG peroxidase	<i>Western blot</i>	1/5000	GE Healthcare	NA931
Anti-rabbit IgG peroxidase	<i>Western blot</i>	1/5000	GE Healthcare	NA934
Anti-rabbit IgG peroxidat	peroxidasa	1/100	Sigma-Aldrich	A0545
Anti-guinea pig IgG peroxidat	peroxidasa	1/100	Sigma-Aldrich	A9167
Cy3 anti-guinea pig	immunofluorescència	1/1000	Jackson IR	706-165-148
Cy3 anti-rabbit	immunofluorescència	1/1000	Jackson IR	711-165-152
Cy2 anti-mouse	immunofluorescència	1/1000	Jackson IR	715-225-150
Cy2 anti-rabbit	immunofluorescència	1/1000	Jackson IR	711-485-152
Hoechst 33258 (Bisbenzimidide)	immunofluorescència	1/1000	Sigma-Aldrich	861405

Llistat d'encebadors utilitzats

GEN	SEQUÈNCIA	APLICACIÓ
Actb	5' TGAGAGGGAAATCGTGCGTG 3' TGCTTGCTGATCCACATCTGC	RT-PCR
Actb promoter	5' AACAAAGAGGCCACACAAATAGG 3' ACCCTCTGGGTGTGGATGTC	ChIP (chromatin immunoprecipitation)
Amy	5' TGGCGTCAAATCAGGAACATG 3' AAAGTGGCTGACAAAGCCCAG	qRT-PCR
Axin2	5' AAAACGGATTCAAGTCCTTCAA 3' GCAAAGACATAGCCGGAACCTA	qRT-PCR
Bambi	5' GATCGCCACTCCAGCTACTTC 3' GCAGGCACTAAGCTCAGACTT	qRT-PCR
Cdkn1a (p21)	5' CCTGGTGATGTCCGACCTG 3' CCATGAGCGCATCGCAATC	qRT-PCR
Gcg	5' AGGAATTCATTGCGTGGCTG 3' CAATGGCGACTTCTTCTGGG	qRT-PCR
Gus	5' CTCATCTGGAATTTGCGCGA 3' GGCGAGTGAAGATCCCCTTC	qRT-PCR
lapp (amilina)	5' CTCCAAACTGGCAGGTGTCC 3' TCCGTTTGTCCATCTGAGGG	qRT-PCR
Igfbp4	5' AGAGAAAGAAAGTGGTGAACATTGAACG 3' CTACGCAGCAGCACAGAGCAGAGG	qRT-PCR/ RT-PCR
Ins	5' AGCGTGGCTTCTTCTACACACC 3' CCAGCTCCAGTTGTGCCACT	qRT-PCR
Insm1 (IA-1)	5' CTGGCGGCGTATCCGAATC 3' CCTGGCGACGGAAGTTCTT	qRT-PCR
Math6	5' AGCCAAGAAACGGAAGGAGTG 3' TCTGGCAGCATCTTGAGGAAG	qRT-PCR
	5' GCATCTCAGAGCTTGGCACC 3' AATCCTCAGGATGGCCAGTTT	RT-PCR

Math6 promoter	5' CAACAAGGCTGGGCAATGAAG 3' CGCCTTTAAAGAAACAGGAAGC	ChIP (chromatin immunoprecipitation)
MyoD promoter	5' CATTGTCCCCTAGCCTTGAG 3' GCCACACGCGGTAGCACTTG	ChIP (chromatin immunoprecipitation)
Neo12	5' CGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG	RT-PCR genotipatge wnt9a
NeuroD1	5' CGCTCTCGCTGTATGATTTGG 3' CACGCAGAAGGCAAGTGTC	qRT-PCR
Neurog3 (ratolí)	5' TTCTCATCGGTACCCTTGCTG 3' GCAGACTCACCAGGAAGTATGG	qRT-PCR/ RT-PCR
Neurog3 (humà)	5' TGGGCTGTGGGTGCTAAGGGTAAG 3' AGGGGTCAGCCAGGGAGAAGCAGA	qRT-PCR
Neurog3 promoter	5' GCCGTTTCCCTCTCTGAGCC 3' GGCATGTGTCCAGACCCCTTTC	ChIP (chromatin immunoprecipitation)
Nkx6.1	5' TGGACAGCAAATCTTCGCCCTG 3' TGTGTAAATCGTCGTCATCCTC	qRT-PCR
Pax4	5' GAGTACCCTGCTCTTTTTGCC 3' ACTCGATTGATAGAGGACACACT	qRT-PCR
Pdx1	5' CCCCAGTTTACAAGCTCGCT 3' CTCGGTTCCATTCCGGGAAAGG	qRT-PCR
Ptf1a	5' ACAAGCCGCTAATGTGCGAGA 3' TTGGAGAGGCGCTTTTCGT	qRT-PCR
Rcan2	5' AGCGACATGGAGGAGGAGGAGGAC 3' GTTATCATGGACGTGCTCAGTTGG	qRT-PCR/ RT-PCR
Shisa2 (Tmem46)	5' GACAGACCGAGAAGGCCAGACAG 3' GAGGATGATGAAGGCAACGAACAC	qRT-PCR/ RT-PCR
Sst	5' ACCCCAGACTCCGTCAGTTTC 3' ATCATTCTCTGTCTGGTTGGGC	qRT-PCR
TBP	5' ACCCTTACCAATGACTCCTATG 3' ATGATGACTGCAGCAAATCGC	qRT-PCR
Tcf7l2	5' GCTGGTCTGCACGGGATAAC 3' GGAAGCGAAAGGCAAGGATTTAG	qRT-PCR
Wnt5a	5' CTTCCGCAAGGTGGGCGATGC 3' TTGCACAGGCGTCCCTGCGTG	RT-PCR
Wnt7b	5' CGCTACGGCATCGACTTTTCTC 3' ATTCCAGCTTCATGCGGTCCTC	qRT-PCR/ RT-PCR
	5' GCGGAATTCATGCACAGAACTTTTCA 3' AGTTCTAGATCACTTGCAGGTGAAGACCTCGG	creació de pCMVTnt-Wnt7b

Wnt9a	5' GGTGGGCAAGCACCTAAAAC 3' GTACAAGCTCTGGTGTTCTGGG	qRT-PCR/ RT-PCR
	5' ACGAATTCATGCTGGATGGGTCCCTTCT 3' CGTCTAGACTACAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTTGTTCGCCCTTGCAGGTATAG	creació de PCCMV-pLpA-Wnt9a; pCDNA3.1-myc.Wnt9a
	5' ACGAATTCATGCTGGATGGGTCCCTTCT 3' CGTCTAGAGGTCAGCCCTTGCAGGTATAG	creació de pCMVTnt-Wnt9a
	5' GCGGCCCAAGCACACTAC 3' GGCACTCCAGGGCACTCAT	qRT-PCR genotipatge
	5' TGA CT TGGCTCAGTGCTCTGGC 3' TCGCTTGAGCAGGCTGGCTCG	RT-PCR genotipatge
Wnt9a promoter	5' AAGCACAGTCGTCCAAGTTTCTCG 3' CTAGGTGTCTGCAGCCAGGACAC	ChIP (chromatin immunoprecipitation)
Wnt9b	5' AGAGGCTTTAAGGAGACGGC 3' GGGGAGTCGTCACAAGTACAG	qRT-PCR/ RT-PCR

Llistat d'adenovirus utilitzats

ADENOVIRUS	ESPÈCIE
Ad. CMV- Mash1	rata
Ad. CMV- Mist1	rata
Ad. CMV- MyoD	ratolí
Ad. CMV- NeuroD1	ratolí
Ad. CMV- NEUROG3	humà
Ad. CMV- NKX2.2	humà
Ad. CMV- Nkx6.1	hàmster
Ad. CMV- Pax4	ratolí
Ad. CMV- Ptf1a	rata
Ad. CMV- shMath6	ratolí
Ad. CMV- shScrambled	ratolí
Ad. CMV- Wnt9a	ratolí
Ad. CMV- β Galactosidasa	ratolí

Llistat de vectors d'expressió utilitzats

VECTOR	ÚS	ORIGEN
pCMVTnt-Wnt9a	assaig luciferasa	Creat durant la tesi
pCMVTnt-Wnt7b	assaig luciferasa	Creat durant la tesi
PCCMV.pLpA-Wnt9a	creació de l'adenovirus per Wnt9a	Creat durant la tesi
pCDNA3.1-myc.Wnt9a	creació de la línia estable NIH3T3-Wnt9a	Creat durant la tesi
TOP-Flash	assaig luciferasa	Cedit pel laboratori de Randall Moon
FOP-Flash	assaig luciferasa	Cedit pel laboratori de Randall Moon
pRL-CMV	assaig luciferasa	Promega
PCIG	assaig luciferasa	Cedit pel laboratori de Sebastià Pons
pCMVTnt	assaig luciferasa	Promega
PCIG- β catenina	assaig luciferasa	Cedit pel laboratori de Sebastià Pons
PCIG-Wnt3a	assaig luciferasa	Cedit pel laboratori de Sebastià Pons
pCMVTnt-flag.Neurog3	assaig luciferasa	Creat al nostre laboratori
pCMVTnt-myc.Math6	assaig luciferasa	Creat al nostre laboratori

ARTICLES PUBLICATS
DURANT LA TESI



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Differentiation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diffSequence and epigenetic determinants in the regulation of the *Math6* gene by Neurogenin3Gemma Pujadas^{a,b,1}, Francesc Felipe^{a,1}, Miriam Ejarque^{a,b}, Lidia Sanchez^{a,b}, Sara Cervantes^{a,b}, Francis C. Lynn^c, Ramon Gomis^{a,b,d}, Rosa Gasa^{a,b,*}^a Diabetes and Obesity Laboratory, Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)—Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain^b CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Barcelona, Spain^c Departments of Surgery and Cellular and Physiological Sciences, University of British Columbia, Vancouver, Canada^d Department of Endocrinology, IDIBAPS—Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2011

Received in revised form

10 May 2011

Accepted 16 May 2011

Available online 14 June 2011

Keywords:

bHLH

Chromatin

Pancreas

Development

Endocrine

Islet

ABSTRACT

The bHLH factor Neurogenin3 initiates the differentiation program that leads to formation of pancreatic endocrine cells. *Math6* is a closely related bHLH factor transiently activated downstream of Neurogenin3 in endocrine progenitors. Here we characterize the *Math6* promoter and locate the Neurogenin3 binding site, thus confirming that *Math6* is a genuine Neurogenin3 target. We also show that *Math6* activation rates are largely controlled by epigenetic mechanisms involving the balance between activating H3K4 and repressive H3K27 methylation marks. High *Math6* expression in the embryonic pancreas associates with an H3K4me3-only state, whereas low *Math6* expression in differentiated endocrine cells correlates with chromatin dually marked with H3K4me3/H3K27me3, a feature originally associated with developmental genes that are repressed but poised for activation in ES cells. Importantly, we show that Neurogenin3 can trigger the conversion of *Math6* from a poorly transcribed bivalent to an active monovalent state *in vitro*, hence providing a mechanism whereby Neurogenin3 may activate *Math6* in endocrine progenitors. Finally, because Neurogenin3-induced changes in histone methylation are observed at other endocrine gene promoters, we propose that this mechanism may contribute to the determination of endocrine cell fate by Neurogenin3 in the pancreas.

© 2011 International Society of Differentiation. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The basic-helix-loop-helix (bHLH) proteins are transcriptional regulators with relevant roles in multiple developmental processes. They comprise an evolutionarily ancient group that shares a common structural motif, the bHLH domain, and regulates transcription through binding as homo- or hetero-dimers to specific DNA sequences known as E boxes (CANNTG) (Jones, 2004; Massari and Murre, 2000). Neurogenins, which are related to the *Drosophila* bHLH gene *atonal*, participate both in neurogenesis and in endocrine differentiation in the gastrointestinal tract (Schönhoff et al., 2004; Vetter and Brown, 2001). In the pancreas, Neurogenin3 (Neurog3) is central in the formation of the endocrine cells that compose the islets of Langerhans (Gradwohl et al., 2000; Gu et al., 2002). It specifies endocrine progenitors among the pool of pancreatic precursor cells and serves as the transcriptional switch that initiates pancreatic

endocrine differentiation during embryogenesis (for reviews see Jensen, 2004; Wilson et al., 2003). Remarkably, Neurog3 can function as a pro-endocrine factor and is sufficient to promote endocrine differentiation in appropriate cellular contexts (Schwitzgebel et al., 2000; Yechoor et al., 2009). Despite its central role, our current understanding on how Neurog3 establishes endocrine cell fate commitment is rather limited, in part because of its transient expression during pancreatic development and the difficulties for isolating early endocrine progenitors. Whole-genome profiling approaches have established the potency and wide range of the transcriptional activity of Neurog3 *in vitro* (Gasa et al., 2004, 2008; Serafimidis et al., 2008), yet only a reduced number of genes have been regarded as direct targets of this transcription factor (Breslin et al., 2007; Smith et al., 2003; Vetere et al., 2010; Wang et al., 2009; Watada et al., 2003). Furthermore, little is known about the molecular mechanisms involved in Neurog3-regulated transcriptional events.

Math6/atonal homolog 8 (hereafter designated as *Math6*) is a bHLH protein that, on the basis of sequence similarity within the bHLH domain, is most closely related to the *atonal* subfamily of bHLH factors (Inoue et al., 2001). However, in contrast to the Neurogenins which are expressed in a tissue-restricted manner, *Math6* has a broader expression pattern and is found in many

* Corresponding author at: Laboratory of Diabetes and Obesity, IDIBAPS, Center Esther Koplowitz, 5th floor, Rosselló, 153, 08036 Barcelona, Spain.
Tel.: +34 93 2275400x2910.

E-mail address: rgasa@clinic.ub.es (R. Gasa).

¹ Contributed equally to this work.

embryonic tissues including the nervous system, kidney, lung, muscle and the gastrointestinal tract (Inoue et al., 2001; Lynn et al., 2008; Ross et al., 2006). The available data about *Math6* suggest that this factor plays relevant roles during development. First, early lethality of *Math6* null embryos demonstrates requirement for this gene in initial stages of embryogenesis (Lynn et al., 2008). Second, its spatial and temporal expression pattern in the embryo is indicative of additional functions in organ morphogenesis and tissue differentiation. In this regard, *Math6* has been implicated in neuronal differentiation during retina development (Inoue et al., 2001; Kubo and Nakagawa, 2010; Yao et al., 2010) and in the development of the kidney (Ross et al., 2006), the skeletal muscle (Yao et al., 2010) and the pancreas (Lynn et al., 2008). *Math6* exhibits a complex expression pattern that appears to be tightly coupled to differentiation events: it is usually broadly expressed in tissues while they undergo active differentiation, but it is down-regulated and/or becomes restricted to specific cell types in mature differentiated tissues and organs (Inoue et al., 2001; Lynn et al., 2008; Ross et al., 2006). Yet, the upstream factors and signals that control its expression are largely unknown. Similarly, the regulatory DNA sequences of the *Math6* gene remain to be characterized. We and others identified *Math6* as a target of Neurog3 via genome-wide microarray screenings in pancreatic duct and embryonic stem cells (Gasa et al., 2008; Serafimidis et al., 2008). We also showed that, besides Neurog3, other pancreatic and non-pancreatic developmental bHLH factors activated *Math6* expression (Lynn et al., 2008), leading us to propose that *Math6* could act as a common node in multiple differentiation programs downstream of lineage-determining bHLH regulators.

In the present study, we have investigated the upstream genomic sequences of the *Math6* gene and identified the *cis*-acting elements mediating its responsiveness to Neurog3. As a result of these studies, we observed that *Math6* expression levels correlated better with the presence of specific histone methylation marks at the endogenous gene than with promoter activity rates in reporter luciferase assays. These observations led us to further investigate the implication of epigenetic events in the transcriptional activation functions of Neurog3. This work provides a mechanism by which *Math6* may be induced in endocrine progenitors and uncovers the ability of Neurog3 and of other pancreatic and neuronal lineage-specific bHLH regulators to instruct changes in the histone methylation code at target chromatin.

2. Material and methods

2.1. Luciferase reporter and expression vectors

A 3.0-kb fragment of 5'-flanking sequence upstream of the *Math6* translation start site was amplified from mouse liver DNA using primers M1 and M2. The amplified region was cloned upstream from the firefly luciferase gene in the KpnI/BamHI sites of the pFOXluc vector. The resulting plasmid was used to generate shorter reporter vectors by restriction digestion followed by religation: 2.2-kb (KpnI/NsiI), 1.7-kb (KpnI/BstXI), 1.0-kb (KpnI/BglII), 0.7-kb (KpnI/PmlI) and 0.3-kb (KpnI/PstI). The 7.7-kb and 5.5-kb promoter constructs were amplified from BAC clone RPC1 22-149-G19 (BACPAC Resources, Oakland, CA) using oligo pairs M3/M4 and M5/M6 and cloned in the KpnI/XhoI and KpnI/SpeI sites of the FOXluc vector respectively. Other reporter constructs were generated by PCR using the 1.0 kb reporter construct as template and oligos M5/M6 (from -255 to +76 nt), M7/M8 (from -42 to +413 nt) and M9/M10 (from -5 to +282 nt). All primer sequences are listed in Supplementary material. To generate mutations in the four most proximal E boxes, we used the

0.6-kb reporter construct and the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The *Renilla* luciferase reporter plasmid pGL4.74 (Promega) was used as transfection control in all luciferase assays.

The mouse Neurog3 (Lynn et al., 2008) coding sequence was inserted into the pBAT12 vector. The mouse E47 cDNA was amplified from 3T3 fibroblastic cells using primers 5'-GCGAATTCGGATG ATGAACCACTCTCAGA-3' and 5'-TAATCCGCGGGTTGTGGCCCTCAC C-3' and cloned into pBAT12. Expression vectors encoding mouse NeuroD1 (pBAT12-NeuroD1) and rat Mash1 (pBAT11-Mash1) were kindly provided by M.S. German (University of California, San Francisco). The expression vector encoding Ptf1a was kindly provided by A. Skoudy (IMIM, Barcelona, Spain).

2.2. Cell culture and adenoviral infection

Cell lines were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium-4.5 g/L glucose (Sigma-Aldrich) plus antibiotics. Medium for mPAC L20, α TC1.6 and β TC3 cell lines was supplemented with 10% fetal bovine serum; medium for 266-6 cells was supplemented with 14% fetal calf serum, 0.0005% β -mercaptoethanol and 2 mM L-glutamine.

For adenoviral infection experiments, 2×10^6 mPAC cells were seeded onto 10cm dishes and incubated 24 h later with adenoviruses at a multiplicity of infection (moi) of 40 for 2 h at 37 °C in culture medium. Then, virus-containing media was replaced and cells were cultured for an additional 42–46 h period. Production of recombinant adenoviruses encoding different bHLH factors and β -galactosidase was previously described (Gasa et al., 2004).

2.3. RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was prepared from cell lines, isolated adult mouse islets or embryonic mouse tissues using the RNeasy kit (Qiagen). RNA samples were treated with DNase to remove contaminating genomic DNA. First-strand cDNA was prepared using 2 μ g of total RNA, Superscript III enzyme (Invitrogen) and random hexamer primers (Invitrogen) in a total volume of 20 μ l. Reverse transcription reaction was carried for 90 min at 50 °C and an additional 10 min at 55 °C. For conventional RT-PCR, 1/20 of the transcribed cDNA was used as template and PCR regime included a 3 min initial denaturalization step at 95 °C followed by 33 cycles for *Math6*, *Neurog3* and *E47* and 24 cycles for *ActB* of 95 °C for 30 s, 56–60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s and final extension at 72 °C for 5 min. For quantification by real time PCR, 1/50 of the transcribed cDNA was used as a template. Real time PCR was performed on an ABI Prism 7900 sequence detection system using SybrGreen reagents (Applied Biosystems). PCR primer sequences are provided in Supplementary material.

2.4. Transient transfections and luciferase assays

Cells were plated onto 24-well culture tissue plates one day before transfection. Transient transfections were performed using Transfast from Promega (mPAC, β TC3, 266) or Metafectene from Biontex (α TC1.6) according to the manufacturer's instructions. The amount of DNA used per well was 500 ng of firefly luciferase reporter vector, 10 ng of pGL4.74 and 50 ng of any co-transfected transcription factor cDNA unless otherwise indicated. Cells were harvested 48 h after transfection and luciferase activity was analyzed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) and a microplate luminometer (Veritas). Luciferase readings were normalized to activities of the internal control vector pGL4.74. All transfections were performed in duplicate on at least 3 occasions.

2.5. Electromobility shift assays

Double-stranded oligonucleotides were 5'-end labeled using (γ -³²P) ATP and T4 polynucleotide kinase (Promega) following manufacturer's instructions. Radiolabeled probes were purified from unincorporated nucleotides using ProbeQuant G-50 micro-columns (GE Healthcare). The E47 and Neurog3 proteins used in gel shift assay were synthesized from plasmids pCMV-TNT-HA.E47 and pCMV-TNT-FLAG.Neurog3 (Lynn et al., 2008) using the TNT coupled transcription–translation kit (Promega). Prior to gel shift assays, proteins were analyzed by western blot analysis using anti-HA and anti-FLAG antibodies (Sigma) to ensure proper synthesis. Binding reactions were conducted in a buffer composed of 10 mM Tris–HCl (pH7.5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glycerol, 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 1 μ g of poly(dI-dC) (Amersham) and 50,000 cpm of radiolabelled probe. Protein–DNA complexes were incubated at room temperature for 20 min and then resolved on a non-denaturing 5% PAGE gel. In some reactions, proteins were pre-incubated with 50-fold molar excess of unlabeled oligonucleotide probes. Oligonucleotide probe sequences are listed in Supplementary material.

2.6. Chromatin IP assays

mPAC cells, α TC1.6 cells and embryonic tissues were fixed in 1% formaldehyde for 10 min. Cross-linking was quenched by addition of 0.125 mM glycine. Cell pellets and tissues were lysed in SDS-containing lysis buffer (50 mM Tris–HCl pH8.1, 10 mM EDTA, 1% SDS). Chromatin was then sheared by sonication, cleared by centrifugation and diluted 1:10 in buffer containing 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris–HCl pH8.1, 16.7 mM NaCl. Antibody binding was carried overnight at 4 °C using 3 μ g of anti-dimethylated or trimethylated lysine 4 histone 3 and anti-trimethylated lysine 27 histone 3 antibodies (Millipore) or normal rabbit IgG as control (Sigma). Antibody-bound complexes were coupled for 15 min to protein G-magnetic beads (Millipore) and washed. Bound material was then eluted from the beads in 50 mM NaHCO₃ containing 1% SDS; cross-linking was reversed by incubation at 67 °C for 6–12 h; and DNA was precipitated in ethanol. DNA pellets were then resuspended in TE and treated with proteinase K (0.4 μ g/ μ l) for 2 h each at 55 °C. DNA was then purified using Qiaquick columns (Qiagen) and eluted in water. Immunoprecipitated DNA was assayed by real time PCR to test for the precipitation of specific promoter fragments with primers listed in Supplementary material. Real time PCR was performed on a LightCycler 480 detection system (Roche) using GoTaq[®] Green Master Mix (Promega). Percentage input enrichment was calculated as follows:

$$2^{-(\text{Cp antibody} - \text{Cp input})} / 2^{-(\text{Cp IgG} - \text{Cp input})}$$

2.7. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance was tested using Student's *t*-test for independent samples and indicated in the figure legends.

3. Results

3.1. Endogenous expression of *Math6* mRNA in pancreatic cell lines

Math6 mRNA is highly expressed in the developing pancreas but its expression decays in the postnatal organ (Lynn et al., 2008). Thus, prior to characterizing *Math6* promoter sequences,

we studied endogenous *Math6* gene expression in pancreas-derived endocrine, exocrine and ductal cell lines. We found that *Math6* mRNA was detectable in all cells tested, albeit with significant differences in relative expression levels as measured by real time PCR (Fig. 1A). Glucagonoma (α TC1.6) exhibited the highest *Math6* mRNA levels among all the cell lines examined. Conversely, ductal mPAC cells exhibited low, yet detectable, *Math6* expression that was similar to that found in adult islets. Finally, insulinoma (β TC3) and exocrine (266-6) cells expressed considerable amounts of *Math6* mRNA that were intermediate between mPAC and α TC1.6 cells.

3.2. Characterization of the promoter activity of 5'-flanking non-coding regions of the *Math6* gene in pancreatic cell lines

To locate potentially important regulatory regions of the *Math6* gene, we analyzed the degree of conservation between 10 kb of genomic upstream sequence of the mouse *Math6* and its human ortholog *HATH6* genes using the mVista algorithm (Frazer et al., 2004). This analysis revealed two highly conserved regions: a proximal fragment extending up to \sim 0.6-kb upstream from the translation start site (82% conservation) and a more distal region located between -6.7 and -6.2 kb from the initial ATG codon (77% conservation) (Fig. 1B).

We next constructed a series of progressive 5' deletions of a 7.7-kb genomic fragment extending to the *Math6* initial ATG, fused them to the firefly luciferase gene and transiently transfected them in the same pancreatic cell lines as above. Maximum reporter activities were low to moderate ranging from 2-fold in mPAC cells to 5–10-fold in the other cell lines (as compared to the promoter-less vector, Fig. 1C). These assays revealed that sequences important for *in vitro* basal promoter activity reside within \sim 1.0-kb upstream from the *Math6* coding sequence. In addition, because deletion from 0.6- to 0.3-kb resulted in important loss of transcriptional activity in all cell lines, it was inferred that sequences between 0.3- and 0.6-kb upstream of the initial ATG codon were essential for *Math6* core promoter activity. Because these sequences coincide with the conserved proximal fragment described above, these findings further reinforce the relevance of this region in the regulation of the *Math6* gene.

Sequence analysis of the proximal region identified a non-canonical TATA box at nucleotides (nt) 438 to 443 upstream from the translation initiation codon, which predicts a 5'-untranslated region (5'-UTR) for the *Math6* mRNA of 413 nt in length (Supplementary Fig. S1A). *In vivo* expression of this long UTR was verified in α TC1.6 and embryonic day (E) 15.5 pancreas by conventional RT-PCR (Supplementary Fig. S1B). Likewise, an extended 5'-UTR has been recently described for the chicken ortholog *Cath6* gene (Kubo and Nakagawa, 2010). In addition to its length and sequence conservation, the *Math6* 5'-UTR is very GC-rich (72%) and highly structured (Supplementary Fig. S1C). Altogether, these features suggest that the 5'-UTR is a potential regulatory region of the *Math6* gene.

3.3. Identification of the *Math6* sequences responsive to Neurog3

In a previous study, we had proposed that Neurog3 would be the upstream activator of *Math6* in endocrine progenitors (Lynn et al., 2008). Because regulation of the *HATH6* gene by Neurog3 was also observed in human cells, we suspected that the conserved *Math6* proximal region might be implicated in this regulation. In line with this possibility, the proximal region contains four putative E boxes (designated from E1 to E4, from proximal to distal), all of which are conserved among different mammalian genes (Supplementary Figs. S1A and S2).

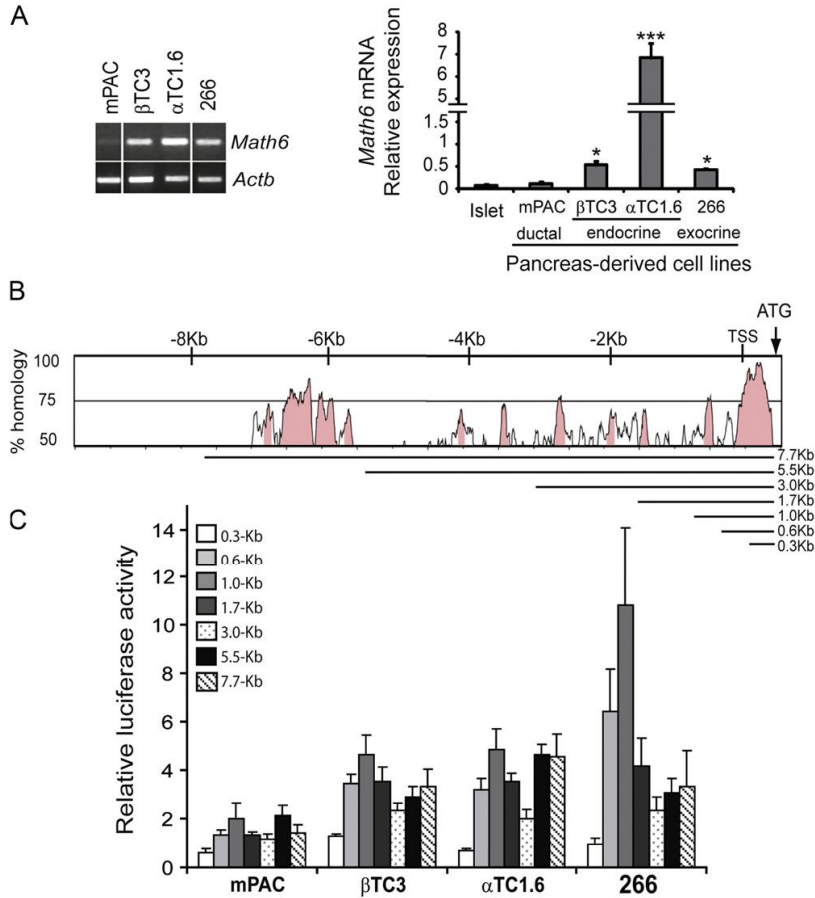


Fig. 1. Endogenous *Math6* expression and *Math6* promoter activity in pancreatic cell lines. (A) Representative image of an ethidium bromide-stained agarose gel showing presence of endogenous *Math6* mRNA in all the indicated pancreatic cell lines by conventional RT-PCR using 32 cycles of amplification. *Beta-actin* (*Actb*) is included as an internal control (left). Relative quantification of *Math6* mRNA levels by real time PCR in adult mouse pancreatic islets and pancreas-derived cell lines (right). Data are expressed relative to glucuronidase (*Gus*) gene expression, used as a normalization control. Results are expressed as mean \pm SEM for 3–4 independent RNA isolations. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ versus islet. (B) Comparative sequence analysis across species. The mVISTA algorithm was used to align 10 kb of the human *HATH6* 5'-flanking sequences to the mouse *Math6* orthologue. (C) Promoter fragments containing sequences extending from the indicated 5'-end to the translation start site of the mouse *Math6* gene were ligated upstream of the *firefly* luciferase gene and transiently co-transfected with a thymidine kinase promoter-driven *Renilla* luciferase reporter plasmid (pGL4.74) into the indicated pancreatic cell lines. Reporter gene activity is expressed relative to the activity of the promoter-less parental vector pFOXLuc (set at 1) in the same cell type. All data are presented as the mean \pm SEM 3–5 independent experiments. For each cell line, luciferase activities of all constructs except 0.3-kb were significantly different from the promoter-less vector ($p < 0.05$).

We began by isolating the minimal promoter capable of responding to Neurog3. Since Neurog3 expression is marginal or absent in pancreatic cell lines (Fig. 2A and data not shown), we co-transfected a vector encoding mouse Neurog3 with several *Math6* luciferase reporter plasmids (from 0.3- to 1.7-kb) in low *Math6*-expressing (mPAC) and high *Math6*-expressing (α TC1.6) cells. Introduction of exogenous Neurog3 increased the reporter activities of all but the 0.3-kb and the promoter-less constructs in both cell types, suggesting that the proximal 0.6-kb fragment retains most of the capacity for Neurog3 activation (Fig. 2B).

The 0.6-kb construct contains the 5'-UTR (including E boxes E1, E2 and E3) in addition to 0.2-kb of upstream untranslated sequence (including E box E4). Deletion of the 5'-UTR region in the 0.6-kb reporter construct yielded a vector unresponsive to Neurog3 (Fig. 2B). Moreover, when fused in front of the TK promoter from the herpes simplex virus (HSV-TK), the 5'-UTR of the *Math6* mRNA conferred responsiveness to Neurog3 to the

resulting reporter vector (Fig. 2C). Altogether, these data confirm that the 5'-UTR of *Math6*, which contains E boxes E1, E2 and E3, mediates regulation by Neurog3 of the *Math6* gene.

To further determine the relative functional relevance of individual E boxes, we performed site-directed mutagenesis of all the E-box elements, individually or in various combinations, from the 0.6-kb reporter construct. Mutation of E3 resulted in the attenuation of the activation of *Math6* promoter sequences by Neurog3, whereas mutations of E1, E2 or E4 had no significant effect on the response to this bHLH factor (Fig. 3A). Furthermore, combinations of mutations in these E boxes rendered a non-responsive reporter vector only when E3 was mutated.

Finally, to confirm the physical interaction between Neurog3 and the E box E3, we conducted EMSA assays using *in vitro* translated proteins. Neurog3 and its dimer partner E47, individually or in combination, were incubated with radiolabelled probes for E2, E3 or E4 and, as a positive control, a probe for the

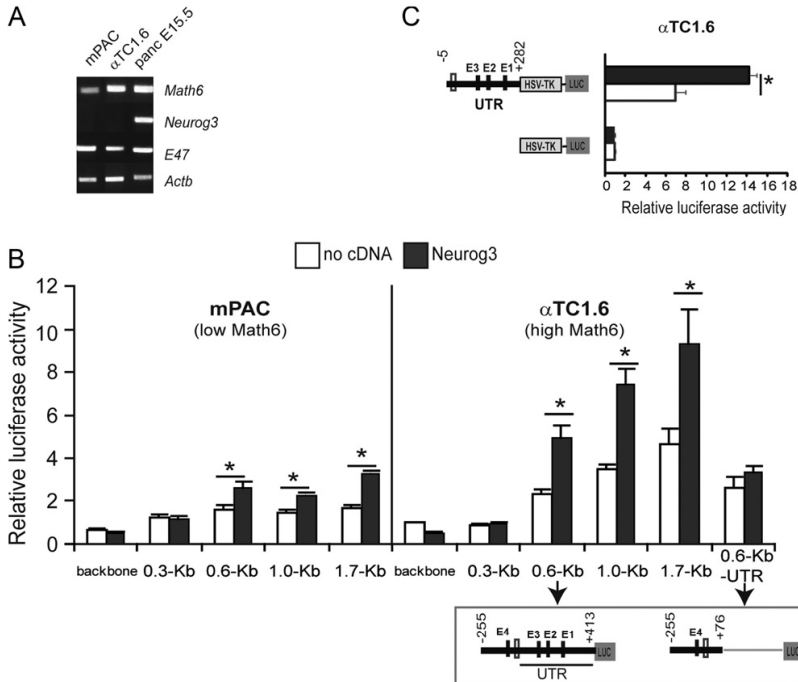


Fig. 2. Identification of the Neuro3 responsive sequences at the *Math6* gene. (A) Endogenous mRNA levels for Neuro3 and its dimer partner E47 in α TC1.6, mPAC and E15.5 pancreas as assessed by conventional RT-PCR (34 cycles). (B) mPAC and α TC1.6 were co-transfected with the indicated *Math6* promoter reporter vectors and either an expression vector encoding Neuro3 (gray bars) or an empty expression vector (empty bars) as control. Luciferase activities are expressed relative to the activity in cells co-transfected with the parental promoter-less reporter vector (backbone) and the empty expression vector (no cDNA), which is set at 1. Data are presented as the mean \pm SEM 4–5 independent experiments. (C) A fragment of the *Math6* 5'-UTR (from -5 to $+282$) was ligated in front of the HSV-TK promoter in the luciferase reporter vector pFOXlucTK. α TC1.6 cells were transiently transfected with this vector or the parental pFOXlucTK and a Neuro3-encoding expression vector or an empty vector as in A. Data shown represent the fold-activation relative to the activity of the parental reporter vector and the empty expression vector (set at 1) and are expressed as mean \pm SEM from 3 independent transfections. * $p < 0.05$ Neuro3 versus no cDNA.

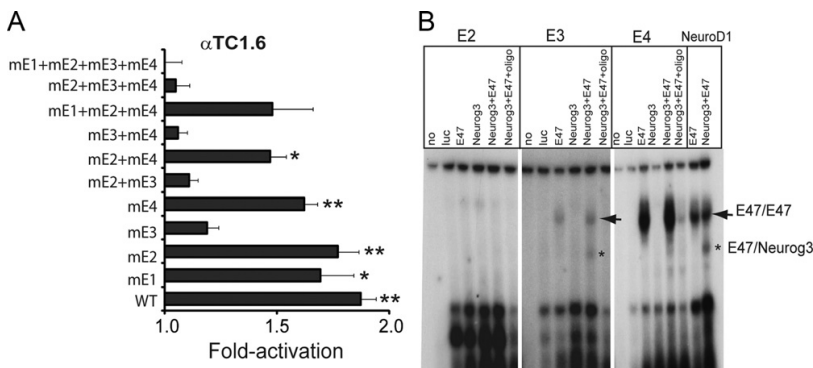


Fig. 3. Identification of the E box mediating the response to Neuro3. (A) Mutational analysis of the four proximal E boxes in the *Math6* promoter in the presence of Neuro3. All constructs were derived from the 0.6-kb *Math6* luciferase reporter construct used in previous experiments. Each reporter vector was co-transfected with Neuro3 or an empty expression vector in α TC1.6 cells. The activation of each construct by Neuro3 is represented as fold-activation (mean \pm SEM) from 4 transfection experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus activity of the construct transfected with the empty expression vector. (B) *In vitro* generated Neuro3 or E47 were tested for binding, individually or in combination, to double-stranded 32 P-labeled oligonucleotides containing the E2, E3 or E4 E boxes of the *Math6* promoter or the E box from the NeuroD1 promoter, as described in Section 2. Negative controls included binding assays with no protein or *in vitro* generated luciferase protein. Arrows indicate retarded bands corresponding to E47 homodimers (slower migrating band) and asterisks indicate E47/Neuro3 heterodimers (faster migrating band). These complexes were not observed when binding assays included a 50-fold excess of unlabeled probe.

Neuro3-binding E box of the NeuroD1 promoter (nucleotides from -224 to -254) (40). Incubation with E47 alone generated a single binding complex (corresponding to the E47 homodimer) with E3, E4 and the NeuroD1-E box, while incubation with

Neuro3 alone generated no complex in any case (Fig. 3B). On the other hand, co-incubation of Neuro3 and E47 with either E3 or NeuroD1-E box, but not E4, generated two complexes: a faster-migrating E47/Neuro3 heterodimer and the previously described

slower migrating E47 homodimer (Fig. 3B). No binding to the E2 probe was observed with either E47 or Neurog3 alone or combined.

Altogether, the results from the reporter assays and EMSA demonstrate that the E-box E3 located in the 5'-UTR is the binding site for Neurog3 at the *Math6* gene. These data is in accordance with our previous ChIP results where we showed that Neurog3 immunoprecipitated DNA fragments proximal to the *Math6* initial ATG codon (Lynn et al., 2008).

3.4. The methylation status of histone 3 at *Math6* proximal sequences determines *Math6* gene expression levels in pancreatic cell lines

Comparison of mRNA data (Fig. 1A) and luciferase reporter assays (Fig. 1C) revealed a poor quantitative correlation between endogenous *Math6* expression and *in vitro* *Math6* promoter activity in pancreatic cell lines. This was particularly obvious for α TC1.6 cells which, despite having the highest *Math6* expression of all the surveyed cells, exhibited *Math6* reporter activities that were only slightly higher than the lowest *Math6*-expressing cells mPAC (2.5-fold). In view of these data, we reasoned that *Math6* gene expression might be largely controlled by additional post-transcriptional and/or epigenetic mechanisms.

The *Math6* gene overlaps a 1.9-kb CpG island that extends from 0.7-kb upstream of the ATG codon into the first intron (Supplementary Fig. S3). Because CpG-rich promoters appear to be to a large extent regulated by epigenetic mechanisms (Carninci et al., 2006), we asked whether *Math6* expression might be influenced by the chromatin status. Among the plethora of chromatin modifications described to this date, di and trimethylation of H3K4 (H3K4me2 and H3K4me3), which associate with active chromatin, and trimethylation of H3K27 (H3K27me3), which correlates with repressed chromatin, have been shown to be highly relevant for determining activity of CpG-rich promoters of developmentally regulated genes (Bernstein et al., 2005, 2006; Mikkelsen et al., 2007; Ruthenburg et al., 2007). Therefore, we compared these histone modifications at the *Math6* gene in α TC1.6 and mPAC cells. As shown in Fig. 4A, in α TC1.6 cells, the *Math6* promoter was highly enriched for H3K4me2/me3 and devoid of repressive H3K27me3, in concordance with the high levels of *Math6* transcription seen in these cells. Indeed, *Math6* displayed a histone methylation profile comparable to that of the highly active genes *beta actin (Actb)* and *NeuroD1*, but opposite to the muscle-specific *MyoD* gene, which is inactive in pancreatic cells.

On the other hand, in mPAC cells, *Math6* was highly enriched in repressive H3K27me3 marks with levels comparable to those found at the *NeuroD1* and *MyoD* genes, both of which are silent in duct cells (Gasa et al., 2004) (Fig. 4B). However, in contrast to these genes, *Math6* was also enriched for active H3K4me2/me3 marks (Fig. 4B). Therefore, the *Math6* promoter is found doubly marked with H3K4me2/me3 and H3K27me3 in mPAC cells. Co-localization of these antagonistic chromatin modifications was first described at the GC-rich promoters of poorly transcribed developmental regulators in embryonic stem (ES) cells and referred to as 'bivalent' domains (Azura et al., 2006; Bernstein et al., 2005; Mikkelsen et al., 2007). Thus, similarly, concurrent occupation of the *Math6* promoter by active (H3K4) and repressive (H3K27) histone methylation marks correlate with low *Math6* expression in mPAC cells.

3.5. Neurog3 triggers the modification of H3K4/H3K27 methylation at the *Math6* gene

Given the observed correlation between the H3K4/H3K27 methylation profile and *Math6* transcription rates, we sought to

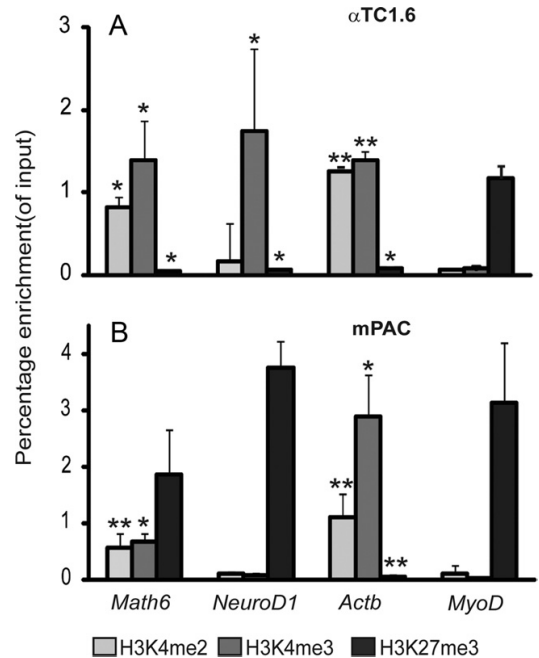


Fig. 4. Characterization of the H3K4 and H3K27 methylation status of the *Math6* gene in pancreatic cell lines. Chromatin from α TC1.6 (A) or mPAC (B) cells was immunoprecipitated with di-methylated H3K4 (H3K4me2), tri-methylated H3K4 (H3K4me3) and tri-methylated H3K27 (H3K27me3) specific antibodies and associated DNA was analyzed by real time PCR using primers from within 1.0-kb from the TSS of the *Math6*, *NeuroD1*, *Beta actin* and *MyoD* genes. Percentage-enrichment relative to input was calculated as described in Section 2. Data represent mean \pm SEM from 3 independent chromatin preparations. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus *MyoD*.

evaluate whether Neurog3-dependent activation of the *Math6* gene was connected to the establishment of an active histone methylation code at the *Math6* locus.

To address this issue, we ectopically expressed Neurog3 in mPAC cells, which results in the activation of endogenous *Math6* gene expression as well as the induction of a significant number of silenced endocrine differentiation markers (Fig. 5C) (Gasa et al., 2004). We found that Neurog3 triggered an extensive removal of repressive H3K27me3 marks across the *Math6* gene from regions far upstream from the Neurog3 binding site onto the *Math6* transcriptional unit (Fig. 5A). Concomitantly, Neurog3 caused a more moderate and localized increase in activating H3K4me3 marks at the proximal promoter and coding sequence regions of the gene (Fig. 5A). In contrast, H3K4me2 enrichment remained unaffected, in agreement with the notion that this modification best correlates with transcription-permissive chromatin rather than transcription rates (Santos-Rosa et al., 2002). Therefore, as a result of the changes triggered by Neurog3, *Math6* resolved from a bivalent to a monovalent state enriched mostly with H3K4me2/me3, which nicely correlates with activation of *Math6* expression. Thus, these data uncover the ability of Neurog3 to induce epigenetic remodeling at the *Math6* locus.

To establish the specificity of the Neurog3 epigenetic effects, we monitored histone methylation at the proximal promoters of the non-target genes *Actb* (active) and *MyoD* (silenced). We found that Neurog3 did not significantly modify either H3K4me3 or H3K27me3 at these genes, thus discarding global non-selective effects on these histone methylation marks (Fig. 5B).

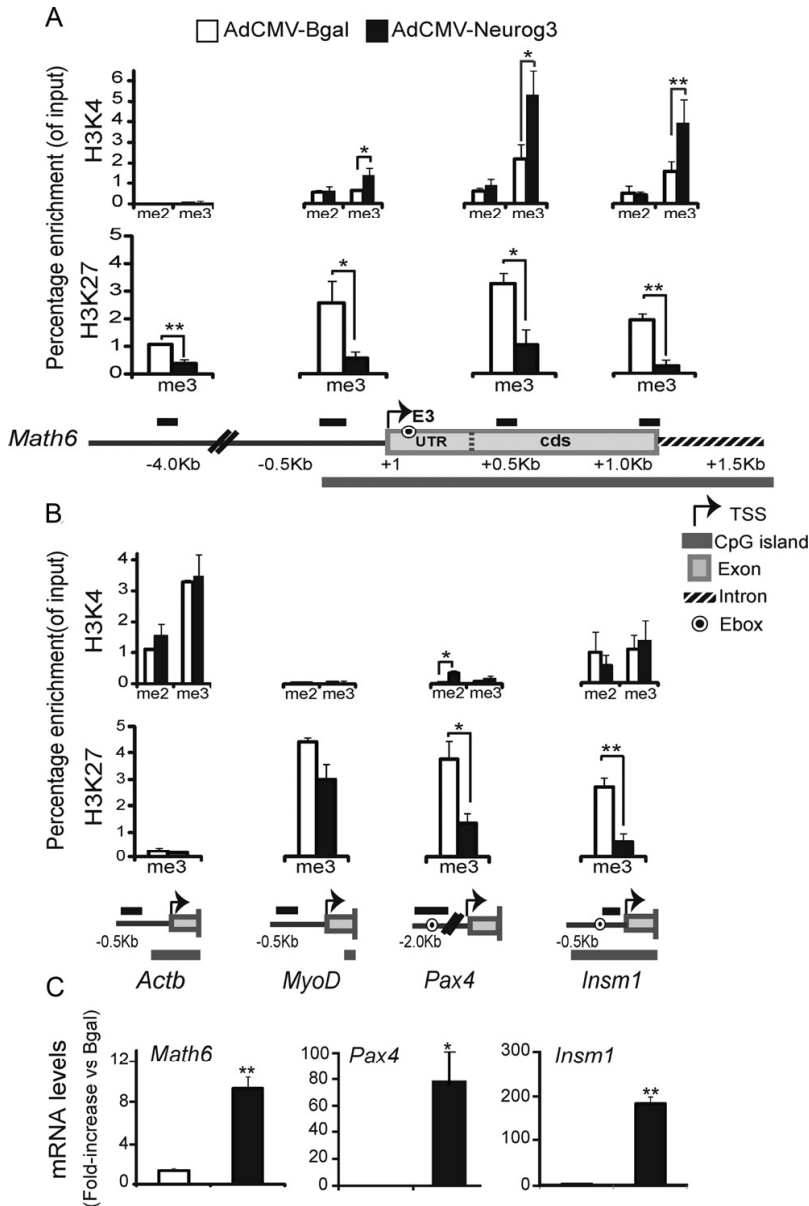


Fig. 5. Neuro3 modifies H3K4 and H3K27 methylation patterns at the *Math6* gene. mPAC cells were treated with recombinant adenoviruses expressing B-galactosidase or Neuro3 as indicated (A,B) chromatin was prepared 44–46 h after infection and immunoprecipitation was carried out using specific antibodies for dimethylated H3K4 (me2), trimethylated H3K4 (me3) and trimethylated H3K27 as depicted. Associated DNA was analyzed by real time PCR using primers that amplified the indicated segments of the *Math6* gene (A), or the *Actb*, *MyoD*, *Pax4* and *Insm1* genes (B). Proximal promoters of the *Actb* and *MyoD* genes were included as controls for non-target constitutively active and for non-target inactive gene, respectively. Primers for *Pax4* and *Insm1* amplified the sequences within the Neuro3-binding regions of Neuro3. Percentage enrichment of input was calculated as described in Section 2. (C) Total RNA was collected 44–46 h after infection and levels of endogenous mRNAs encoding the indicated genes relative to glucuronidase (*Gus*) gene were quantified by real time RT-PCR and expressed as fold-increase versus expression in cells treated with B-galactosidase set at 1. Data represent mean \pm SEM from 4 independent over-expression experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Neuro3 versus Bgal. TSS: Transcription Start Site.

Next, to determine the extent of Neuro3-mediated changes in histone methylation, we investigated the methyl profile of the known Neuro3 targets *Pax4* and *Insm1*. Correlating with induction of their expression from undetectable levels (Fig. 5C), we observed that Neuro3 altered H3K4 and H3K27 methyl profiles

at genomic sites near the reported Neuro3 recognition motifs on these genes (Smith et al., 2003; Breslin et al., 2007), further confirming the specificity of Neuro3-promoted chromatin remodeling. The studied *Pax4* region, which located at -2 kb from the *Pax4* TSS and was devoid of H3K4me2/me3 but enriched with

H3K27me₃, became marked with H3K4me₂ *de novo* and depleted of H3K27me₃ in response to Neurog3 (Fig. 5B). The selective enrichment with H3K4me₂ and not H3K4me₃ agrees with previous reports showing that genomic sites located far from gene starts exhibit mainly dimethylation (Bernstein et al., 2005). On the other hand, *Insm1* was dually marked with methylated H3K4/H3K27 in control cells and resolved, like *Math6*, to methylated H3K4 upon expression of Neurog3. Yet, in this case, this occurred by selective removal of H3K27me₃ marks without detectable changes in H3K4me₃/me₃ levels (Fig. 5B).

Taken together, our results suggest that changes in the histone methylation code, particularly removal of H3K27me₃ repressive marks, are involved in transcriptional activation events regulated by Neurog3. Future studies should aim to establish how this Neurog3-dependent chromatin remodeling activity contributes to the functional competency of this key transcription factor during endocrine cell differentiation.

3.6. Lineage-specific bHLH regulators induce removal of H3K27me₃ marks at the *Math6* gene

Apart from Neurog3, several tissue-specific bHLH factors, including NeuroD1 (neuroendocrine), Mash1 (neuronal) and Ptf1a (exocrine), can induce *Math6* expression *in vitro* (Lynn et al., 2008). Here we asked whether these transcriptional regulators used mechanisms similar to Neurog3 to activate the *Math6* gene. Firstly, we performed luciferase reporter assays and found that all of them trans-activated the 0.6-kb *Math6* promoter construct. Secondly, we investigated whether they triggered changes in the H3K27 methylation state. As depicted in Fig. 6B, we found that they all induced the removal of this mark at the *Math6* proximal sequences. Therefore, it appears that these bHLH regulators can indiscriminately use the *cis*-acting region and alike epigenetic mechanisms to induce transcriptional activation of the *Math6* gene. Given the ubiquitous expression pattern of *Math6*, our observations underscore the possibility that different tissue-specific bHLH regulators might utilize similar strategies to modulate *Math6* expression in different cellular contexts. It should be noted that the observed shared ability of Neurog3 and Ptf1a to remove H3K27me₃ marks fits nicely with the *in vivo* observation that *Math6* is occupied mainly by H3K4me₂/me₃ in the E15.5 embryonic pancreas (see below), a stage at which endocrine and exocrine differentiation programs driven by these two bHLH transcription factors are vigorously active (Gittes, 2009).

3.7. The H3K4/H3K27 methylation status of the *Math6* proximal promoter correlates with *Math6* mRNA levels *in vivo*

Lastly, to establish the significance of the preceding *in vitro* findings in the regulation of *Math6* expression patterns *in vivo*, we studied H3K4 and H3K27 methylation profiles at the *Math6* locus in various embryonic tissues, including the pancreas, which express *Math6* at different rates (Fig. 7A). We found that H3K4me₂ and H3K4me₃ were present at the *Math6* gene in both high *Math6*-expressing tissues (pancreas and brain) and, albeit more weakly, in low *Math6*-expressing liver. Conversely, *Math6* was devoid of H3K27me₃ in pancreas and brain, while this mark was largely deposited across the *Math6* locus in liver (Fig. 7B).

We also checked whether modulation of H3K4 and H3K27 methylation patterns correlated with the down-regulation of *Math6* expression in differentiated endocrine cells. As shown in Fig. 7B, low *Math6* expression rates in adult pancreatic islets associated with the presence of dual H3K4me₃/H3K27me₃ marks as we had previously observed in mPAC cells. Interestingly, apart from acquisition of repressive H3K27me₃ marks, pancreatic islets differed from the fetal pancreas in the distribution of the activation-related H3K4me₃ mark across the *Math6* gene. In this regard,

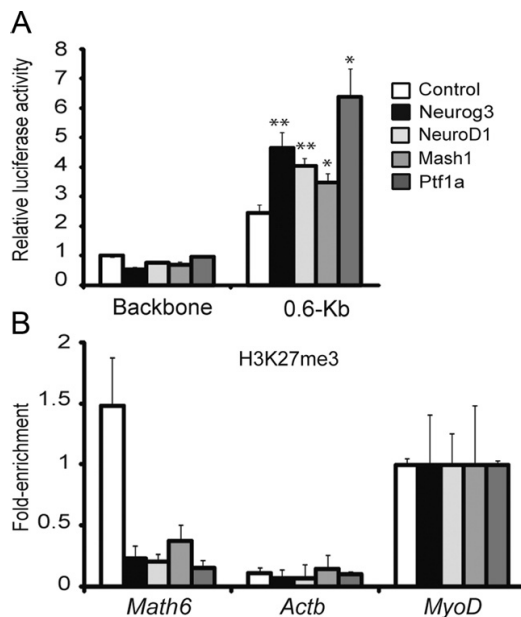


Fig. 6. Regulation of the *Math6* gene by various tissue-specific bHLH factors. (A) α TC1.6 cells were co-transfected with the indicated *Math6* reporter vectors and expression plasmids containing the CMV promoter driving expression of either no cDNA (control) or cDNAs encoding the bHLH proteins indicated. Luciferase activities are expressed relative to the activity of the promoter-less luciferase vector co-transfected with the expression plasmid containing no cDNA. Results are expressed as mean \pm SEM from 3 independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ different bHLH factors versus no cDNA. (B) Chromatin was prepared from mPAC cells treated with recombinant adenoviruses encoding the indicated bHLH factors or B-galactosidase as control, and immunoprecipitation was carried out using a specific antibody for trimethylated H3K27. Associated DNA was analyzed by real time PCR using primers that amplified the proximal promoters of the *Math6*, *Actb* and *MyoD* genes as depicted in Fig. 5. Fold-enrichment relative to input was calculated as described in Section 2 and results are expressed relative to enrichment at the *MyoD* promoter in the same chromatin (set at 1). Data represent mean \pm SEM from 2–3 independent over-expression experiments.

we observed that H3K4me₃ levels were similarly enriched at the proximal promoter and coding sequence in islets, whereas this modification peaked (> 8 -fold) at transcribed sequences in the fetal pancreas (Fig. 3B), in agreement with prominent enrichment for H3K4me₃ downstream of the TSS of active genes (Bernstein et al., 2006; Li et al., 2007). The high intensity of H3K4me_{2/3} marks at transcription units of genes has been linked to events related to the progression of RNA polymerase II after promoter clearance (Li et al., 2007; Pray-Grant et al., 2005; Santos-Rosa et al., 2002). Thus, the specific loss of H3K4me₃ at the *Math6* coding sequence in islets relative to the embryonic pancreas may reflect decreased transcriptional elongation rates, thereby contributing – in addition to weaker promoter activity – to low *Math6* transcript abundance in this tissue. Altogether, these data confirm that H3K4 and H3K27 methyl profiles discriminate between low and high *Math6* transcriptional states *in vivo* and support the notion that bHLH-dependent modulation of these modifications is relevant for the regulation of *Math6* expression during development.

4. Discussion

This work represents the first analysis of *Math6* gene promoter sequences available in the literature and provides the framework

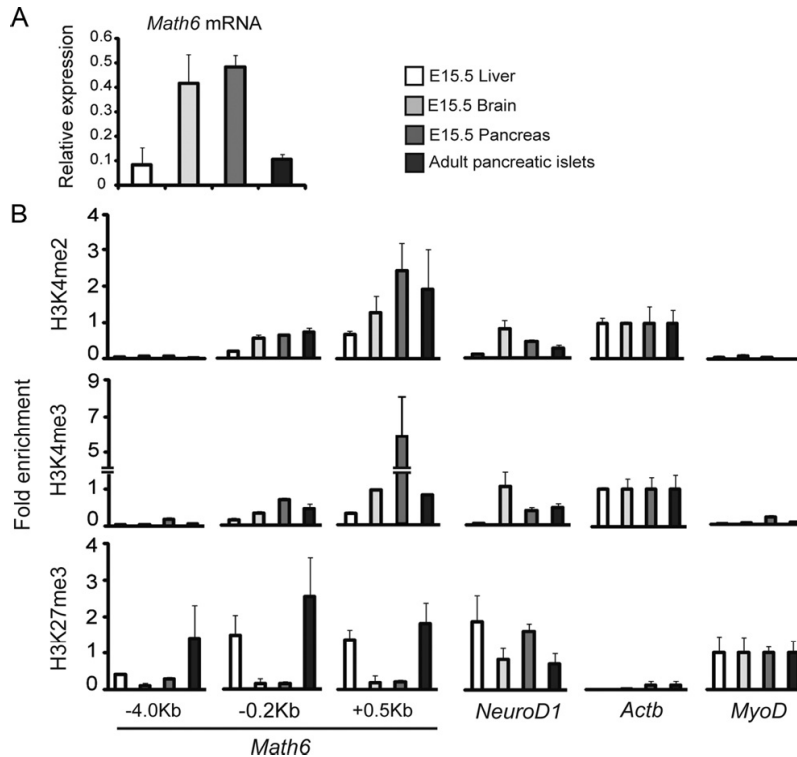


Fig. 7. Characterization of the H3K4 and H3K27 methylation status of the *Math6* gene in embryonic tissues and isolated adult pancreatic islets. (A) Relative abundance of *Math6* mRNA in pancreas, brain and liver from E15.5 embryos and in pancreatic islets isolated from 8–10 wk male mice was assessed by real time RT-PCR using *Gus* as internal control. Data are mean \pm SEM for $n=3$. (B) Chromatin from the indicated tissues was immunoprecipitated with dimethylated H3K4 and trimethylated H3K4 or H3K27. The associated DNA was analyzed by real time PCR using primers from within the indicated regions of the *Math6* gene (relative to TSS) and within the 0.5 kb proximal promoters of the *NeuroD1*, *beta actin* and *MyoD* genes. Percentage enrichment of input was calculated as described in Section 2 and results are expressed relative to enrichment at the *Actb* (H3K4) or *MyoD* (H3K27) promoters in the same chromatin (set at 1). *NeuroD1* was included as a control for a gene expressed in embryonic pancreas and brain and whose expression is maintained in adult pancreatic islets. Data represent mean \pm SEM 3–4 independent chromatin preparations.

for future experiments on the regulation of this developmental transcription factor. We show that the *Math6* promoter is controlled by epigenetic mechanisms involving at least two histone modifications, H3K4 and H3K27 methylation, which determine not only basal expression rates but are also involved in the regulation of the *Math6* gene by lineage-specific bHLH factors.

Previous *in vivo* and *in vitro* data indicated that *Math6* lies downstream of *Neurog3* in endocrine pancreas development. In the present study, we have identified one specific E box that functions as the *Neurog3* recognition site and is essential for trans-activation of the *Math6* gene by *Neurog3* in pancreatic cells, thus proving that the *Math6* gene is a genuine target of *Neurog3*. Our results draw attention to the 5'-UTR of the *Math6* mRNA as an important regulatory region of the *Math6* gene. In most vertebrate mRNAs, the 5'-UTR is 10–200 nt long, unstructured and not very GC-rich (60%). In contrast, the 5'-UTR of *Math6* (413 nt and 72% GC content) belongs to the less common class of long and GC-rich 5'-UTRs found in 10% of vertebrate genes, most of which code for regulatory proteins. Whilst it has been long accepted that extended and highly structured 5'-UTRs participate in post-transcriptional regulation of gene expression (Mignone et al., 2002; Wilkie et al., 2003), more recently they have emerged as important sites controlling transcriptional activity of their respective genes. Our present data on the involvement of the 5'-UTR in mediating the activation of the *Math6* gene in response to *Neurog3* represents an example of this transcriptional role, which

has been described for other genes as well (Gilley et al., 2003; Sandri et al., 2004; Tanaka et al., 2001).

This study uncovers an important role for epigenetic mechanisms in determining *Math6* gene activation rates. We find that promoter reporter activities in transient transfection assays reflect poorly *Math6* gene expression levels in pancreas-derived cell lines. On the contrary, *Math6* expression closely correlates with enrichment for H3K4/H3K27 methylation marks at the *Math6* locus. These results underscore the relevance of epigenetic events in controlling *Math6* expression and are in agreement with previous suggestions that this may be a widespread trait in the regulation of CpG-rich promoters (Carninci et al., 2006). We show that low *Math6* expression in islets and duct cells correlates with bivalent chromatin enriched for opposite H3K4me3 and H3K27me3 marks, a feature originally associated with GC-rich promoters of developmental transcription factors in stem cells. In these cells, bivalent domains are thought to maintain genes partially repressed but poised for rapid activation upon specific developmental cues (Azuara et al., 2006; Bernstein et al., 2005; Mikkelsen et al., 2007). However, consistent with our findings, bivalent domains have also been found in cells with more restricted potency and in terminally differentiated cells (Mohn et al., 2008; Pan et al., 2007). Thus, whether *Math6* bivalency serves similar regulatory purposes in differentiated endocrine and ductal cells is an interesting idea. Alternatively, bivalent states may simply be the consequence of a GC-rich sequence which

favors, in the absence of specific strong activating signals, the co-occurrence of K4 and K27 methylation, as recently speculated (Mohn et al., 2008). Elucidation of the precise biological functions of *Math6* should provide valuable information that may help clarify whether bivalency at the *Math6* promoter in certain differentiated cell types is relevant for the regulation of *Math6*.

During cellular differentiation the bivalent imprint wanes and, at individual genes, either H3K27me3 or H3K4me3 remains thus leading to tissue-specific patterns of gene expression. Data mining of three published genome-wide data sets revealed that *Math6* is among the group of genes displaying dual H3K4/H3K27 methylation marks in ES cells (Mikkelsen et al., 2007; Pan et al., 2007; Zhao et al., 2007). Here we report that during pancreatic differentiation, correlating with induction of its expression, the *Math6* gene exhibits an H3K4me2/me3-only state. Likewise, *Math6* resolves to an H3K4 monovalent status upon neuronal differentiation in ES cells (Mikkelsen et al., 2007). Intriguingly, the active H3K4me2/me3 state is transient and *Math6* regains a bivalent status upon terminal differentiation both in endocrine and in acinar cells (data not shown), in correlation with the broad down-regulation of *Math6* expression observed in the adult pancreas. Therefore, from these data, it is deduced that bivalent domains may be dynamically regulated during differentiation programs and that repressive H3K27me3 marks may be re-deposited at certain loci, probably when expression of the associated gene is no longer required.

An important question that remains poorly understood is which are the developmental signals that trigger these changes in the H3K4/H3K27 methyl code. On the basis of our results on the *Math6* gene, we propose that bHLH factors that function as cell fate determinants in the pancreas and brain may instruct the resolution of target bivalent domains during their respective differentiation programs. The fact that H3K4me3/H3K27me3 dually marked genes are poorly expressed suggests that the repressive H3K27me3 marks are dominant over the activating effects of H3K4me3 when both marks are present (Barski et al., 2007). H3K27me3 marks are transmitted from one cell generation to the next to maintain specific gene expression programs (Hansen et al., 2008), thus these marks need to be eliminated in order to allow expression of developmentally regulated genes. We demonstrate that expression of a lineage-specific bHLH factor is sufficient to trigger the removal of H3K27me3 marks at specific loci *in vitro*, thus suggesting that these proteins could act as instructors of these epigenetic changes during development. Interestingly, a recent study has described the selective loss of bivalent and H3K27me3-repressed chromatin in a set of neural developmental genes in endocrine progenitors during pancreatic development (van Arensbergen et al., 2010). Given that Neurogens regulate cell fate decisions both in endocrine and neural development, it is enticing to propose that Neurog3 could be the determining activator in these events.

These data reveal a previously unappreciated link between Neurog3 and histone methylation and, in consequence, with Polycomb and Trithorax group proteins that warrants further investigations (Ringrose and Paro, 2004; Schuettengruber et al., 2007). Moreover, on account of the prevailing role assigned to H3K27me3 marks in the developmental potential of progenitor cells, our findings on the specific Neurog3-dependent removal of this modification (not only on the *Math6* gene but also at other target genes) indicate that this function of Neurog3 may be central in cell fate decisions imposed by this regulator. However, we have also observed that induction of the *NeuroD1* gene by Neurog3 is not accompanied by substantial changes in H3K27me3 levels at this gene (data not shown), suggesting the existence of gene-specific mechanisms whereby Neurog3 regulates transcription. Intriguingly, *NeuroD1* induction is delayed as compared

to other Neurog3 targets (Gasa et al., 2004), which raises the point as to whether differences in temporal patterns of transcriptional activation may reflect distinct underlying epigenetic events, or vice versa. Future studies should focus on establishing the genome-broad impact of Neurog3-dependent epigenetic events as well as on identifying the epigenetic modifiers and other co-regulators that collaborate with Neurog3 in these tasks. Hopefully, a greater comprehension of Neurog3 function will enable further optimization of the development of cell-based therapies for treatment of diabetes.

In conclusion, the available *in vivo* and *in vitro* data point to an important role of *Math6* in tissue differentiation and organismal development. Here, we have characterized for the first time the proximal 5' flanking sequences of the mouse *Math6* gene and identified the *cis*-regulatory elements and a potential molecular mechanism involved in its activation by the pro-endocrine factor Neurog3. Additionally, this analysis evidences that the control of *Math6* expression is complex and may be subject to different layers of regulation at the transcriptional, post-transcriptional and epigenetic level, thus reinforcing a prominent role for this factor during development. These data further our knowledge of the molecular mechanisms that regulate expression of this little-known bHLH transcription factor and the bHLH transcriptional cascade that functions during endocrine cell development in the pancreas.

Acknowledgments

We thank M. Párrizas and A. Postigo for helpful discussions and suggestions. This work has been supported by Grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2005-06080, BFU2008-02299/BMC and SAF2006-07382), the Associació Catalana de Diabetis and the Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1426). FF and GP are recipients of postdoctoral (EX2005-0414) and predoctoral (BES-2007-17284) fellowships from the Spanish Ministry of Science and Innovation. ME and SC are recipients of an IDIBAPS predoctoral and an IDIBAPS-Marie Curie postdoctoral fellowship, respectively.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.diff.2011.05.006.

References

- Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jorgensen, H.F., John, R.M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merckenschlager, M., Fisher, A.G., 2006. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* 8, 532–538.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K., 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823–837.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas 3rd, E.J., Gingeras, T.R., Schreiber, S.L., Lander, E.S., 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120, 169–181.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L., Lander, E.S., 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315–326.
- Breslin, M.B., Wang, H.W., Pierce, A., Aucoin, R., Lan, M.S., 2007. Neurogenin 3 recruits CBP co-activator to facilitate histone H3/H4 acetylation in the target gene *INSM1*. *FEBS Lett.* 581, 949–954.
- Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C.A., Taylor, M.S., Engstrom, P.G., Frith, M.C., Forrest, A.R., Alkema, W.B., Tan, S.L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T., Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Kitazume, Y., Kawaji, H., Kai, C., Nakamura, M., Konno, H., Nakano, K., Mottagui-Tabar, S., Arner, P., Chesi, A., Gustincich, S., Persichetti, F., Suzuki, H., Grummond, S.M., Wells, C.A., Orlando, V., Wahlestedt,

- C, Liu, E.T., Harbers, M., Kawai, J., Bajic, V.B., Hume, D.A., Hayashizaki, Y., 2006. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat. Genet.* 38, 626–635.
- Frazer, K.A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E.M., Dubchak, I., 2004. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 32, W273–W279.
- Gasa, R., Mrejen, C., Leachman, N., Otten, M., Barnes, M., Wang, J., Chakrabarti, S., Mirmira, R., German, M., 2004. Proendocrine genes coordinate the pancreatic islet differentiation program in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 13245–13250.
- Gasa, R., Mrejen, C., Lynn, F.C., Skewes-Cox, P., Sanchez, L., Yang, K.Y., Lin, C.H., Gomis, R., German, M.S., 2008. Induction of pancreatic islet cell differentiation by the neurogenin-neuroD cascade. *Differentiation* 76, 381–391.
- Gilley, J., Coffey, P.J., Ham, J., 2003. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* 162, 613–622.
- Gittes, G.K., 2009. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev. Biol.* 326, 4–35.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., Guillemot, F., 2000. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1607–1611.
- Gu, G., Dubauskaite, J., Melton, D.A., 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129, 2447–2457.
- Hansen, K.H., Bracken, A.P., Pasini, D., Dietrich, N., Gehani, S.S., Monrad, A., Rappilber, J., Lerdrup, M., Helin, K., 2008. A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nat. Cell Biol.* 10, 1291–1300.
- Inoue, C., Bae, S.K., Takatsuka, K., Inoue, T., Bessho, Y., Kageyama, R., 2001. Math6, a bHLH gene expressed in the developing nervous system, regulates neuronal versus glial differentiation. *Genes Cells* 6, 977–986.
- Jensen, J., 2004. gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev. Dyn.* 229, 176–200.
- Jones, S., 2004. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol.* 5, 226.
- Kubo, F., Nakagawa, S., 2010. Cath6, a bHLH atonal family proneural gene, negatively regulates neuronal differentiation in the retina. *Dev. Dyn.* 239, 2492–2500.
- Li, B., Carey, M., Workman, J.L., 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707–719.
- Lynn, F.C., Sanchez, L., Gomis, R., German, M.S., Gasa, R., 2008. Identification of the bHLH factor Math6 as a novel component of the embryonic pancreas transcriptional network. *PLoS One* 3, e2430.
- Massari, M.E., Murre, C., 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell Biol.* 20, 429–440.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., Pesole, G., 2002. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 3, REVIEWS0004.
- Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.K., Koche, R.P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E.S., Bernstein, B.E., 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553–560.
- Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T.C., Richter, J., Stadler, M.B., Bibel, M., Schubeler, D., 2008. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol. Cell* 30, 755–766.
- Pan, G., Tian, S., Nie, J., Yang, C., Ruotti, V., Wei, H., Jonsson, G.A., Stewart, R., Thomson, J.A., 2007. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 1, 299–312.
- Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates 3rd, J.R., Grant, P.A., 2005. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 433, 434–438.
- Ringrose, L., Paro, R., 2004. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Ann. Rev. Genet.* 38, 413–443.
- Ross, M.D., Martinka, S., Mukherjee, A., Sedor, J.R., Vinson, C., Bruggeman, L.A., 2006. Math6 expression during kidney development and altered expression in a mouse model of glomerulosclerosis. *Dev. Dyn.* 235, 3102–3109.
- Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., Wysocka, J., 2007. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol. Cell* 25, 15–30.
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H., Goldberg, A.L., 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117, 399–412.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J., Kouzarides, T., 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407–411.
- Schonhoff, S.E., Giel-Moloney, M., Leiter, A.B., 2004. Minireview: development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* 145, 2639–2644.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., Cavalli, G., 2007. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 128, 735–745.
- Schwitzgebel, V.M., Scheel, D.W., Connors, J.R., Kalamaras, J., Lee, J.E., Anderson, D.J., Sussel, L., Johnson, J.D., German, M.S., 2000. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127, 3533–3542.
- Serafimidis, I., Rakatzi, I., Episkopou, V., Gouti, M., Gavalas, A., 2008. Novel effectors of directed and Ngn3-mediated differentiation of mouse embryonic stem cells into endocrine pancreas progenitors. *Stem Cells* 26, 3–16.
- Smith, S.B., Gasa, R., Watada, H., Wang, J., Griffen, S.C., German, M.S., 2003. Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4. *J. Biol. Chem.* 278, 38254–38259.
- Tanaka, M., Ito, S., Kiuchi, K., 2001. The 5'-untranslated region of the mouse glial cell line-derived neurotrophic factor gene regulates expression at both the transcriptional and translational levels. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 91, 81–95.
- van Arensbergen, J., Garcia-Hurtado, J., Moran, I., Maestro, M., Xu, X., Van de Casteele, M., Skoudy, A., Palasini, M., Heimberg, H., Ferrer, J., 2010. Derepression of Polycomb targets during pancreatic organogenesis allows insulin-producing beta-cells to adopt a neural gene activity program. *Genome Res.* 20, 722–723.
- Vetere, A., Li, W.C., Paroni, F., Fuhr, K., Guo, L., Nishimura, W., Dai, X., Bonner-Weir, S., Sharma, A., 2010. OVO homologue-like 1 (Ovol1) transcription factor: a novel target of neurogenin-3 in rodent pancreas. *Diabetologia* 53, 115–122.
- Vetter, M.L., Brown, N.L., 2001. The role of basic helix-loop-helix genes in vertebrate retinogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 491–498.
- Wang, H.W., Breslin, M.B., Chen, C., Akerstrom, V., Zhong, Q., Lan, M.S., 2009. INSM1 promoter-driven adenoviral herpes simplex virus thymidine kinase cancer gene therapy for the treatment of primitive neuroectodermal tumors. *Hum. Gene Ther.* 20, 1308–1318.
- Watada, H., Scheel, D.W., Leung, J., German, M.S., 2003. Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells. *J. Biol. Chem.* 278, 17130–17140.
- Wilkie, G.S., Dickson, K.S., Gray, N.K., 2003. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem. Sci.* 28, 182–188.
- Wilson, M.E., Scheel, D., German, M.S., 2003. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech. Dev.* 120, 65–80.
- Yao, J., Zhou, J., Liu, Q., Lu, D., Wang, L., Qiao, X., Jia, W., 2010. Atoh8, a bHLH transcription factor, is required for the development of retina and skeletal muscle in zebrafish. *PLoS One* 5, e10945.
- Yeichoor, V., Liu, V., Espiritu, C., Paul, A., Oka, K., Kojima, H., Chan, L., 2009. Neurogenin3 is sufficient for transdetermination of hepatic progenitor cells into neo-islets in vivo but not transdifferentiation of hepatocytes. *Dev. Cell* 16, 358–373.
- Zhao, X.D., Han, X., Chew, J.L., Liu, J., Chiu, K.P., Choo, A., Orlov, Y.L., Sung, W.K., Shahab, A., Kuznetsov, V.A., Bourque, G., Oh, S., Ruan, Y., Ng, H.H., Wei, C.L., 2007. Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 1, 286–298.

