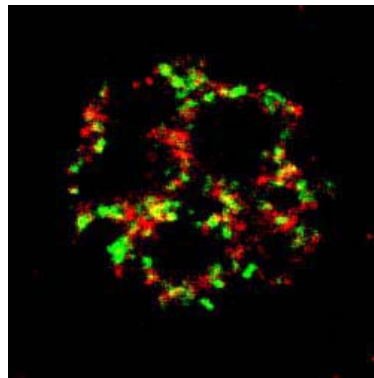


Universitat de Barcelona
Facultat de Biologia
Dpt de Bioquímica i Biologia Molecular

**Funciones *in vivo*
del regulador transcripcional
HNF1 α (MODY3)**



Reina Fdez de Luco, 2007



BIBLIOGRAFÍA

1. Agalioti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D. 2000. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*. **103(4)**:667-78.
2. PMID: 11106736 [PubMed - indexed for MEDLINE]
3. Agalioti T, Chen G, Thanos D. 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*. **111(3)**:381-92.
4. Ahmad, K. and S. Henikoff. 2002. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Molecular Cell* **9**: 1191-1200.
5. Alberti, K.G.M.M. and P.Z. Zimmet. 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus - Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine* **15**: 539-553.
6. Arney, K.L. and A.G. Fisher. 2004. Epigenetic aspects of differentiation. (vol 117, pg 4355, 2004). *Journal of Cell Science* **117**.
7. Araki, E., S. Oyadomari, and M. Mori. 2003. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus. *Experimental Biology and Medicine* **228**:1213-1217.
8. Atkinson, M.A. and N.K. Maclaren. 1994. Mechanisms of Disease - the Pathogenesis of Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus. *New England Journal of Medicine* **331**: 1428-1436.
9. Bach, I., M. Pontoglio, and M. Yaniv. 1992. Structure of the Gene Encoding Hepatocyte Nuclear Factor 1 (Hnf1). *Nucleic Acids Research* **20**: 4199-4204.
10. Balint, B.L., A. Szanto, A. Madi, U.M. Bauer, P. Gabor, S. Benko, L.G. Puskas, P.J.A. Davies, and L. Nagy. 2005. Arginine methylation provides epigenetic transcription memory for retinoid-induced differentiation in myeloid cells. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 5648-5663.
11. Bantignies, F. and G. Cavalli. 2006. Cellular memory and dynamic regulation of polycomb group proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **18**: 275-283.
12. Barbacci, E., M. Reber, M.O. Ott, C. Breillat, F. Huetz, and S. Cereghini. 1999. Variant Hepatocyte Nuclear Factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* **126**: 4795-4805.
13. Barroso, I., M. Gurnell, V.E.F. Crowley, M. Agostini, J.W. Schwabe, M.A. Soos, G.L. Maslen, T.D.M. Williams, H. Lewis, A.J. Schafer, V.K.K. Chatterjee, and S.O'Rahilly. 1999. Dominant negative mutations in human PPAR gamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* **402**: 880-883.
14. Beards, F., T. Frayling, M. Bulman, Y. Horikawa, L. Allen, M. Appleton, G.I. Bell, S. Ellard, and A.T. Hattersley. 1998. Mutations in hepatocyte

- nuclear factor 1 beta are not a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the UK. *Diabetes* **47**: 1152-1154.
15. Becker, P.B. and W. Horz. 2002. ATP-dependent nucleosome modeling. *Annual Review of Biochemistry* **71**: 247-273.
 16. Becknielsen, H. and L.C. Groop. 1994. Metabolic and Genetic Characterization of Prediabetic States - Sequence of Events Leading to Non-Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus. *Journal of Clinical Investigation* **94**: 1714-1721.
 17. Bernal-Mizrachi, E., W. Wen, S. Stahlhut, C.M. Welling, and M.A. Permutt. 2001. Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *Journal of Clinical Investigation* **108**: 1631-1638.
 18. Bernstein, B.E., T.S. Mikkelsen, X.H. Xie, M. Kamal, D.J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S.L. Schreiber, and E.S. Lander. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**: 315-326.
 19. Bystricky K, Heun P, Gehlen L, Langowski J, Gasser SM. 2004. Long-range compaction and flexibility of interphase chromatin in budding yeast analyzed by high-resolution imaging techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101(47)**: 16495-500
 20. Blumenfeld, M., M. Maury, T. Chouard, M. Yaniv, and H. Condamine. 1991. Hepatic Nuclear Factor-I (Hnf1) Shows A Wider Distribution Than Products of Its Known Target Genes in Developing Mouse. *Development* **113**: 589-599.
 21. Blyszczuk, P., J. Czyz, G. Kania, M. Wagner, U. Roll, L. St Onge, and A.M. Wobus. 2003. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 998-1003.
 22. Boj, S.F., M. Parrizas, M.A. Maestro, and J. Ferrer. 2001. A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 14481-14486.
 23. Boutin, P., L. Gresh, A. Cisse, M. Hara, G. Bell, S. Babu, G. Eisenbarth, and P. Froguel. 1999. Missense mutation Gly574Ser in the transcription factor HNF-1 alpha, is a marker of atypical diabetes mellitus in African-American children. *Diabetologia* **42**: 380-381.
 24. Bracken, A.P., N. Dietrich, D. Pasini, K.H. Hansen, and K. Helin. 2006. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes & Development* **20**: 1123-1136.
 25. Bradbury, E.M. 1992. Reversible Histone Modifications and the Chromosome Cell-Cycle. *Bioessays* **14**: 9-16.

26. Branco, M.R. and A.Pombo. 2006 Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *Plos Biol* **4**:780-788
27. Breiling,A., L.P.O'Neill, D.D'Eliseo, B.M.Turner, and V.Orlando. 2004. Epigenome changes in active and inactive Polycomb-group-controlled regions. *Embo Reports* **5**: 976-982.
28. Brown,K.E., S.Amoils, J.M.Horn, V.J.Buckle, D.R.Higgs, M.Merkenschlager, and A.G.Fisher. 2001. Expression of alpha- and beta-globin genes within different nuclear domains in haemopoietic cells. *Nature Cell Biology* **3**: 602-606.
29. Brown,K.E., J.Baxter, D.Graf, M.Merkenschlager, and A.G.Fisher. 1999. Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Molecular Cell* **3**: 207-217.
30. Brown,K.E., S.S.Guest, S.T.Smale, K.Hahm, M.Merkenschlager, and A.G.Fisher. 1997. Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* **91**: 845-854.
31. Byrne MM, Sturis J, Fajans SS, Ortiz FJ, Stoltz A, Stoffel M, Smith MJ, Bell GI, Halter JB, Polonsky KS. 1995 Altered insulin secretory responses to glucose in subjects with a mutation in the MODY1 gene on chromosome 20. *Diabetes*. **44(6)**:699-704.
32. Byrne MM, Sturis J, Menzel S, Yamagata K, Fajans SS, Dronsfield MJ, Bain SC, Hattersley AT, Velho G, Froguel P, Bell GI, Polonsky KS 1996 Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. *Diabetes*. **45(11)**:1503-10.
33. Cao,R., L.J.Wang, H.B.Wang, L.Xia, H.Erdjument-Bromage, P.Tempst, R.S.Jones, and Y.Zhang. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science* **298**: 1039-1043.
34. Cao,R. and Y.Zhang. 2004. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current Opinion in Genetics & Development* **14**: 155-164.
35. Carbone, G.M., S.Napoli, A.Valentini, F.Cavalli, D.K.Watson, and C.V.Catapano. 2004. Triplex DNA-mediated downregulation of Ets2 expression results in growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer cells. *Nucleic Acids Research* **32**:4358-4367.
36. Cardozo, A.K., F.Ortis, J.Storling, Y.M.Feng, J.Rasschaert, M.Tonnesen, F.Van Eylen, T.Mandrup-Poulsen, A.Herchuez, and D.L.Eizirik. 2005. Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca²⁺-ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca²⁺, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **54**:452-461
37. Caron,H., B.van Schaik, M.van der Mee, F.Baas, G.Riggins, P.van Sluis, M.C.Hermus, R.van Asperen, K.Boon, P.A.Voute, S.Heisterkamp, A.van Kampen, and R.Versteeg. 2001. The human transcriptome map:

- Clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science* **291**: 1289-+.
38. Casolari JM, Brown CR, Komili S, West J, Hieronymus H, Silver PA. 2004 Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell*. **117(4)**:427-39.
39. Cerasi,E. and R.Luft. 1967. Plasma Insulin Response to Glucose Infusion in Healthy Subjects and in Diabetes Mellitus. *Acta Endocrinologica* **55**: 278-&.
40. Cereghini,S. 1996. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *Faseb Journal* **10**: 267-282.
41. Cereghini,S., M.Blumenfeld, and M.Yaniv. 1988b. A Liver-Specific Factor Essential for Albumin Transcription Differs Between Differentiated and Dedifferentiated Rat Hepatoma-Cells. *Genes & Development* **2**: 957-974.
42. Cereghini,S., M.Blumenfeld, and M.Yaniv. 1988a. A Liver-Specific Factor Essential for Albumin Transcription Differs Between Differentiated and Dedifferentiated Rat Hepatoma-Cells. *Genes & Development* **2**: 957-974.
43. Cereghini,S., M.O.Ott, S.Power, and M.Maury. 1992. Expression Patterns of Vhnf1 and Hnf1 Homeoproteins in Early Postimplantation Embryos Suggest Distinct and Sequential Developmental Roles. *Development* **116**: 783-797.
44. Cereghini,S., M.Yaniv, and R.Cortese. 1990. Hepatocyte Dedifferentiation and Extinction Is Accompanied by A Block in the Synthesis of Messenger-Rna Coding for the Transcription Factor Hnf1/Lfb1. *Embo Journal* **9**: 2257-2263.
45. Chadwick,B.P. and H.F.Willard. 2004. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **101**: 17450-17455.
46. Chambeyron,S. and W.A.Bickmore. 2004. Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes & Development* **18**: 1119-1130.
47. Chen,Z.Z., J.Y.Zang, J.Whetstine, X.Hong, F.Davrazou, T.G.Kutateladze, M.Simpson, Q.L.Mao, C.H.Pan, S.D.Dai, J.Hagman, K.Hansen, Y.Shi, and G.Y.Zhang. 2006. Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell* **125**: 691-702.
48. Cheung,P., C.D.Allis, and P.Sassone-Corsi. 2000. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* **103**: 263-271.
49. Chevre,J.C., E.H.Hani, P.Boutin, M.Vaxillaire, H.Blanche, N.Vionnet, V.C.Pardini, J.Timsit, E.Larger, G.Carpentier, D.Beckers, M.Maes, C.Bellanne-Chantelot, G.Velho, and P.Froguel. 1998. Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia* **41**: 1017-1023.

50. Chevre, J.C., E.H.Hani, D.A.Stoffers, J.F.Habener, and P.Froguel. 1998. Insulin promoter factor 1 gene is not a major cause of maturity-onset diabetes of the young in French Caucasians. *Diabetes* **47**: 843-844.
51. Chow, C.M., A.Georgiou, H.Szutorisz, A.M.E.Silva, A.Pombo, I.Barahona, E.Dargelos, C.Canzonetta, and N.Dillon. 2005. Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *Embo Reports* **6**: 354-360.
52. Chubb, J.R. and W.A.Bickmore. 2003. Considering nuclear compartmentalization in the light of nuclear dynamics. *Cell* **112**: 403-406.
53. Chubb, J.R., S.Boyle, P.Perry, and W.A.Bickmore. 2002. Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Current Biology* **12**: 439-445.
54. Clark, D., M.Reitman, V.Studitsky, J.Chung, H.Westphal, E.Lee, and G.Felsenfeld. 1993. Chromatin Structure of Transcriptionally Active Genes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **58**: 1-6.
55. Clark, S.W., B.E.Fee, and J.L.Cleveland. 2002. Misexpression of the eyes absent family triggers the apoptotic program. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 3560-3567
56. Cook, P.R. 2002. Predicting three-dimensional genome structure from transcriptional activity. *Nature Genetics* **32**: 347-352.
57. Costa FF. Non-coding RNAs: Lost in translation? 2006 *Gene*. Ahead of print
58. Costanzi, C. and J.R.Pehrson. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**: 599-601.
59. Courtois, G., J.G.Morgan, L.A.Campbell, G.Fourel, and G.R.Crabtree. 1987. Interaction of A Liver-Specific Nuclear Factor with the Fibrinogen and Alpha-1-Antitrypsin Promoters. *Science* **238**: 688-692.
60. Cremer, T. and C.Cremer. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics* **2**: 292-301.
61. Croft, J.A., J.M.Bridger, S.Boyle, P.Perry, P.Teague, and W.A.Bickmore. 1999. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *Journal of Cell Biology* **145**: 1119-1131.
62. Csink, A.K. and S.Henikoff. 1998. Something from nothing: The evolution and utility of satellite repeats. *Trends in Genetics* **14**: 200-204.
63. Cuthbert, G.L., S.Daujat, A.W.Snowden, H.Erdjument-Bromage, T.Hagiwara, M.Yamada, R.Schneider, P.D.Gregory, P.Tempst, A.J.Bannister, and T.Kouzarides. 2004. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**: 545-553.
64. Daniel, J.A., M.G.Pray-Grant, and P.A.Grant. 2005. Effector proteins for methylated histones - An expanding family. *Cell Cycle* **4**: 919-926.

65. Deeney JT, Prentki M, Corkey BE. 2000 Metabolic control of beta-cell function. *Semin Cell Dev Biol.* **11(4)**:267-75. Review
66. DeFronzo, R.A. 1988. The Triumvirate - Beta-Cell, Muscle, Liver - A Collusion Responsible for Niddm. *Diabetes* **37**: 667-687.
67. Dernburg, A.F., K.W. Broman, J.C. Fung, W.F. Marshall, J. Philips, D.A. Agard, and J.W. Sedat. 1996. Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell* **85**: 745-759.
68. Diabetes Epidemiology Research International Group. Secular trends in incidence of childhood IDDM in 10 countries. *Diabetes* **39**, 858-864. 1990.
69. Dou, Y.L., T.A. Milne, A.J. Tackett, E.R. Smith, A. Fukuda, J. Wysocka,
70. C.D. Allis, B.T. Chait, J.L. Hess, and R.G. Roeder. 2005. Physical association and coordinate function of the H3K4 methyltransferase MLL1 and the H4K16 acetyltransferase MOF. *Cell* **121**: 873-885.
71. Dukes ID, Sreenan S, Roe MW, Levisetti M, Zhou YP, Ostrega D, Bell GI, Pontoglio M, Yaniv M, Philipson L, Polonsky KS. 1998. Defective pancreatic beta-cell glycolytic signaling in hepatocyte nuclear factor-1alpha-deficient mice. *J Biol Chem.* **273(38)**:24457-64.
72. Dunder, M. and T. Misteli. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochemical Journal* **356**: 297-310.
73. Eberharter, A. and P.B. Becker. 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin - Second in review series on chromatin dynamics. *Embo Reports* **3**: 224-229.
74. Edlund, H. 2002. Pancreatic organogenesis - Developmental mechanisms and implications for therapy. *Nature Reviews Genetics* **3**: 524-532.
75. Elowitz, M.B., A.J. Levine, E.D. Siggia, and P.S. Swain. 2002. Stochastic gene expression in a single cell. *Science* **297**: 1183-1186.
76. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2000. Report of the Expert Committee of the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **23**: S4-S19.
77. Fagot-Campagna, A., D.J. Pettitt, M.M. Engelgau, N.R. Burrows, L.S. Geiss, R. Valdez, G.L.A. Beckles, J. Saaddine, E.W. Gregg, D.F. Williamson, and K.M.V. Narayan. 2000. Type 2 diabetes among North American children and adolescents: An epidemiologic review and a public health perspective. *Journal of Pediatrics* **136**: 664-672.
78. Fajans, S.S., G.I. Bell, and K.S. Polonsky. 2001. Mechanisms of disease: Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *New England Journal of Medicine* **345**: 971-980.
79. Feldman, N., A. Gerson, J. Fang, E. Li, Y. Zhang, Y. Shinkai, H. Cedar, and Y. Bergman. 2006. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nature Cell Biology* **8**: 188-U55.

80. Felsenfeld,G. and M.Groudine. 2003. Controlling the double helix. *Nature* **421**: 448-453.
81. Ferber, S., A.Halkin, H.Cohen, I.Ber, Y.Einav, I.Goldberg, I.Barshack, R.Seijffers, J.Kopolovic, N.Kaiser, and A.Karasik. 2000. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nature Medicine* **6**:568-572
82. Ferrer,J. 2002. A genetic switch in pancreatic beta-cells - Implications for differentiation and haploinsufficiency. *Diabetes* **51**: 2355-2362.
83. Festenstein,R. and D.Kioussis. 2000. Locus control regions and epigenetic chromatin modifiers. *Current Opinion in Genetics & Development* **10**: 199-203.
84. Fischle,W., Y.M.Wang, S.A.Jacobs, Y.C.Kim, C.D.Allis, and S.Khorasanizadeh. 2003. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes & Development* **17**: 1870-1881.
85. Frain,M., G.Swart, P.Monaci, A.Nicosia, S.Stampfli, R.Frank, and R.Cortese. 1989. The Liver-Specific Transcription Factor Lf-B1 Contains A Highly Diverged Homeobox Dna-Binding Domain. *Cell* **59**: 145-157.
86. Francastel,C., W.Magis, and M.Groudine. 2001. Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 12120-12125.
87. Francis,N.J., R.E.Kingston, and C.L.Woodcock. 2004. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* **306**: 1574-1577.
88. Frayling,T.M., M.P.Bulman, S.Ellard, M.Appleton, M.J.Dronsfield, A.D.R.Mackle, J.D.Baird, P.J.Kaisaki, K.Yamagata, G.I.Bell, S.C.Bain, and A.T.Hattersley. 1997. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the UK. *Diabetes* **46**: 720-725.
89. Froguel,P., H.Zouali, N.Vionnet, G.Velho, M.Vaxillaire, F.Sun, S.Lesage, M.Stoffel, J.Takeda, P.Passa, M.A.Permutt, J.S.Beckmann, G.I.Bell, and D.Cohen. 1993. Familial Hyperglycemia Due to Mutations in Glucokinase - Definition of A Subtype of Diabetes-Mellitus. *New England Journal of Medicine* **328**: 697-702.
90. Gall,J.G. 2000. Cajal bodies: The first 100 years. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**: 273
91. Garcia-Ocana, A., K.K.Takane, M.A.Syed, W.M.Philbrick, R.C.Vasavada, and A.F.Stewart. 2000. Hepatocyte growth factor overexpression in the islet of transgenic mice increases beta cell proliferation, enhances islet mass, and induces mild hypoglycemia. *Journal of Biological Chemistry* **275**:1226-1232.

92. Gasser, S.M. 2001. Positions of potential: Nuclear organization and gene expression. *Cell* 104:639-642
93. Gasser, S.M. 2002. Nuclear architecture - Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science* **296**: 1412-1416.
94. Gautier, J.F., C. Bellanne-Chantelot, D. Dubois-Laforgue, J.M. Wilhelm, C. Boitard, S. Clauin, L.H. Noel, G. Velho, D. Chauveau, and J. Timsit. 2002. Multi-organ damage in MODY5 related to mutations of the Hepatocyte Nuclear Factor-1 beta Gene. *Diabetes* **51**: A260.
95. George, M., E. Ayuso, A. Casellas, C. Costa, J.C. Devedjian, and F. Bosch. 2002. beta cell expression of IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 109:1153-1163
96. Gilbert N, Boyle S, Fiegler H, Woodfine K, Carter NP, Bickmore WA. 2004. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell*. **118(5)**:555-66.
97. Glucksmann, M.A., M. Lehto, O. Tayber, S. Scotti, L. Berkemeier, J.C. Pulido, Y. Wu, W.J. Nir, L. Fang, P. Markel, K.D. Munnely, J. Goranson, M. Orho, B.M. Young, J.L. Whitacre, C. McMenimen, M. Wantman, T. Tuomi, J. Warram, C.M. Forsblom, M. Carlsson, J. Rosenzweig, G. Kennedy, G.M. Duyk, A.S. Krolewski, L.C. Groop, and J.D. Thomas. 1997. Novel mutations and a mutational hotspot in the MODY3 gene. *Diabetes* **46**: 1081-1086.
98. Gorisch SM, Wachsmuth M, Toth KF, Lichter P, Rippe K. 2005. Histone acetylation increases chromatin accessibility. *J Cell Sci*. **118(Pt 24)**:5825-34
99. Gragnoli, C., T. Lindner, B.N. Cockburn, P.J. Kaisaki, F. Gragnoli, G. Marozzi, and G.I. Bell. 1997. Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene. *Diabetes* **46**: 1648-1651.
100. Grande, M.A., d.K. van, I, L. de Jong, and R. van Driel. 1997. Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *J. Cell Sci*. **110 (Pt 15)**: 1781-1791.
101. Grant, S.F.A., G. Thorleifsson, I. Reynisdottir, R. Benediktsson, A. Manolescu, J. Sainz, A. Helgason, H. Stefansson, V. Emilsson, A. Helgadóttir, U. Styrkarsdóttir, K.P. Magnusson, G.B. Walters, E. Palsdóttir, T. Jonsdóttir, T. Gudmundsdóttir, A. Gylfason, J. Saemundsdóttir, R.L. Wilensky, M.P. Reilly, D.J. Rader, Y. Bagger, C. Christiansen, V. Gudnason, G. Sigurdsson, U. Thorsteinsdóttir, J.R. Gulcher, A. Kong, and K. Stefansson. 2006. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* **38**: 320-323.
102. Grewal, I.S., B.J. Rutledge, J.A. Fiorillo, L. Gu, R.P. Gladue, R.A. Flavell, and B.J. Rollins. 1997. Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte-rich insulinitis without diabetes - Abrogation by a second transgene expressing systemic MCP-1. *Journal of Immunology* 159:401-408

103. Grimaud,C., F.Bantignies, M.Pal-Bhadra, P.Ghana, U.Bhadra, and G.Cavalli. 2006. RNAi components are required for nuclear clustering of polycomb group response elements. *Cell* **124**: 957-971.
104. Grimaud,C., N.Negre, and G.Cavalli. 2006. From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Research* **14**: 363-375.
105. Groop,L.C., E.Widen, and E.Ferrannini. 1993. Insulin-Resistance and Insulin Deficiency in the Pathogenesis of Type-2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetes-Mellitus - Errors of Metabolism Or of Methods. *Diabetologia* **36**: 1326-1331.
106. Grunstein,M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**: 349-352.
107. Habener,J.F. and D.A.Stoffers. 1998. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proceedings of the Association of American Physicians* **110**: 12-21.
108. Hagenfeldt-Johansson,K.A., P.L.Herrera, H.Y.Wang, A.Gjinovci, H.Ishihara, and C.B.Wollheim. 2001. beta-cell-targeted expression of a dominant-negative hepatocyte nuclear factor-1 alpha induces a maturity-onset diabetes of the young (MODY)3-like phenotype in transgenic mice. *Endocrinology* **142**: 5311-5320.
109. Hall,I.M., G.D.Shankaranarayana, K.I.Noma, N.Ayoub, A.Cohen, and S.I.S.Grewal. 2002. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* **297**: 2232-2237.
110. Hansen,S.K., M.Parrizas, M.L.Jensen, S.Pruhova, J.Ek, S.F.Boj, A.Johansen, M.A.Maestro, F.Rivera, H.Eiberg, M.Andel, J.Lebj, O.Pedersen, J.Ferrer, and T.Hansen. 2002. Genetic evidence that HNF-1 alpha-dependent transcriptional control of HNF-4 alpha is essential for human pancreatic beta cell function. *Journal of Clinical Investigation* **110**: 827-833.
111. Hansen,T., H.Eiberg, M.Rouard, M.Vaxillaire, A.M.Moller, S.K.Rasmussen, M.Fridberg, S.A.Urhammer, J.J.Holst, K.Almind, S.M.Echwald, L.Hansen, G.I.Bell, and O.Pedersen. 1997. Novel MODY3 mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene - Evidence for a hyperexcitability of pancreatic beta-cells to intravenous secretagogues in a glucose-tolerant carrier of a P447L mutation. *Diabetes* **46**: 726-730.
112. Harries,L.W., A.T.Hattersley, and S.Ellard. 2004. Messenger RNA transcripts of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene containing premature termination codons are subject to nonsense-mediated decay. *Diabetes* **53**: 500-504.
113. Hattersley,A.T., R.C.Turner, M.A.Permutt, P.Patel, Y.Tanizawa, K.C.Chiu, S.Orahilly, P.J.Watkins, and J.S.Wainscoat. 1992. Linkage of Type-2 Diabetes to the Glucokinase Gene. *Lancet* **339**: 1307-1310.

114. Hatzis,P. and I.Talianidis. 2002. Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Molecular Cell* **10**: 1467-1477.
115. Hauer, C.R., I.Rebrin, B.Thony, F.Neuheiser, H.C.Curtius, P.Hunziker, N.Blau, S.Ghisla, and C.W.Heizmann. 1993. Phenylalanine Hydroxylase-Stimulating Protein Pterin-4-Alpha-Carbinolamine Dehydratase from Rat and Human Liver - Purification, Characterization, and Complete Amino-Acid-Sequence. *Journal of Biological Chemistry* **268**:4828-4831
116. Haumaitre,C., E.Barbacci, M.Jenny, M.O.Ott, G.Gradwohl, and S.Cereghini. 2005. Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 1490-1495.
117. Hegele,R.A., H.I.Cao, S.B.Harris, A.J.G.Hanley, and B.Zinman. 1999. The hepatic nuclear factor-1 alpha G319S variant is associated with early-onset type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84**: 1077-1082.
118. Heremans, Y., M.Van De Castele, P.I.Veld, G.Gradwohl, P.Serup, O.Madsen, D.Pipeleers, and H.Heimberg. 2002. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *Journal of Cell Biology* **159**:303-311.
119. Herman,W.H., S.S.Fajans, F.J.Ortiz, M.J.Smith, J.Sturis, G.I.Bell, K.S.Polonsky, and J.B.Halter. 1994. Abnormal Insulin-Secretion, Not Insulin-Resistance, Is the Genetic Or Primary Defect of Mody in the Rw Pedigree. *Diabetes* **43**: 40-46.
120. Hernandez-Munoz,I., P.Taghavi, C.Kuijl, J.Neefjes, and M.van Lohuizen. 2005. Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 11047-11058.
121. Heun, P., T.Laroche, K.Shimada, P.Furrer, and S.M.Gasser. 2001. Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science* **294**:2181-2186.
122. Hofmann WA, Stojiljkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, Philimonenko V, Kysela K, Goodrich JA, Lessard JL, Hope TJ, Hozak P, de Lanerolle P. 2004 Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol.* **6(11)**:1094-101. Epub 2004 Oct 24.
123. Holst,J.J. 1994. Glucagon-Like Peptide-1 - A Newly Discovered Gastrointestinal Hormone. *Gastroenterology* **107**: 1848-1855.
124. Horikawa,Y. 2000. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus (vol 26, pg 163, 2000). *Nature Genetics* **26**: 502.
125. Horikawa,Y., N.Iwasaki, M.Hara, H.Furuta, Y.Hinokio, B.N.Cockburn, T.Lindner, K.Yamagata, M.Ogata, O.Tomonaga, H.Kuroki, T.Kasahara, Y.Iwamoto, and G.I.Bell. 1997. Mutation in hepatocyte

- nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nature Genetics* **17**: 384-385.
126. Horn PJ, Peterson CL. 2002 Molecular biology. Chromatin higher order folding: wrapping up transcription. *Science*. **297(5588)**:1824-7. Review.
127. Howman, E.V., K.J.Fowler, A.J.Newson, S.Redward, A.C.MacDonald, P.Kalitsis, and K.H.A.Choo. 2000. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1148-1153.
128. Huang, S.M., M.Litt, and G.Felsenfeld. 2005. Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. *Genes & Development* **19**: 1885-1893.
129. Huang Y, Fang J, Bedford MT, Zhang Y, Xu RM. 2006 Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science*. **312(5774)**:748-51
130. Iborra, F.J., A.Pombo, D.A.Jackson, and P.R.Cook. 1996. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription 'factories' in human nuclei. *Journal of Cell Science* **109**: 1427-1436.
131. International Human Genome Sequencing Consortium. 2004 Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**: 931-945
132. Ishii, K., G.Arib, C.Lin, G.Van Houwe, and U.K.Laemmli. 2002. Chromatin boundaries in budding yeast: The nuclear pore connection. *Cell* **109**: 551-562.
133. Isomaa, B., M.Henricsson, M.Lehto, C.Forsblom, S.Karanko, L.Sarelin, M.Hagglom, and L.Groop. 1998. Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. *Diabetologia* **41**: 467-473.
134. Jackson, D.A., A.B.Hassan, R.J.Errington, and P.R.Cook. 1993. Visualization of Focal Sites of Transcription Within Human Nuclei. *Embo Journal* **12**: 1059-1065.
135. Jenuwein, T. and C.D.Allis. 2001. Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080.
136. Kadonaga, J.T. 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* **116**: 247-257.
137. Kaisaki, P.J., S.Menzel, T.Lindner, N.Oda, I.Rjasanowski, J.Sahm, G.Meincke, J.Schulze, H.Schmechel, C.Petzold, H.M.Ledermann, G.Sachse, V.V.Boriraj, R.Menzel, W.Kerner, R.C.Turner, K.Yamagata, and G.I.Bell. 1997. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene in MODY and early-onset NIDDM - Evidence for a mutational hotspot in exon 4. *Diabetes* **46**: 528-535.
138. Karpen, G.H. and R.C.Allshire. 1997. The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends in Genetics* **13**: 489-496.

139. Katan-Khaykovich, Y. and K. Struhl. 2002. Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors. *Genes & Development* **16**: 743-752.
140. Kieffer, T.J. and J.L. Habener. 1999. The glucagon-like peptides. *Endocrine Reviews* **20**: 876-913.
141. Kimura, H., Y. Tao, R.G. Roeder, and P.R. Cook. 1999. Quantitation of RNA polymerase II and its transcription factors in an HeLa cell: Little soluble holoenzyme but significant amounts of polymerases attached to the nuclear substructure. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 5383-5392.
142. Klymenko, T. and J. Muller. 2004. The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins. *EMBO Rep.* **5**: 373-377.
143. Kosak, S.T. and M. Groudine. 2004a. Form follows function: the genomic organization of cellular differentiation. *Genes & Development* **18**: 1371-1384.
144. Kosak, S.T. and M. Groudine. 2004b. Gene order and dynamic domains. *Science* **306**: 644-647.
145. Kosak, S.T., J.A. Skok, K.L. Medina, R. Riblet, M.M. Le Beau, A.G. Fisher, and H. Singh. 2002. Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* **296**: 158-162.
146. Krajewski, W.A. and P.B. Becker. 1998. Reconstitution of hyperacetylated, DNase I-sensitive chromatin characterized by high conformational flexibility of nucleosomal DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1540-1545
147. Kutlu, B., A.K. Cardozo, M.I. Darville, M. Kruhoffer, N. Magnusson, T. Orntoft, and D.L. Eizirik. 2003. Discovery of gene networks regulating cytokine-induced dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells. *Diabetes* **52**: 2701-2719.
148. Lachner, M., R.J. O'Sullivan, and T. Jenuwein. 2003. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *Journal of Cell Science* **116**: 2117-2124.
149. de Lanerolle P, Johnson T, Hofmann WA. 2005 Actin and myosin I in the nucleus: what next? *Nat Struct Mol Biol.* **12(9)**: 742-6. Review.
150. Lazzaro, D., V. Desimone, L. Demagistris, E. Lehtonen, and R. Cortese. 1992. Lfb1 and Lfb3 Homeoproteins Are Sequentially Expressed During Kidney Development. *Development* **114**: 469-479.
151. Ledermann, H.M. 1995. Is Maturity-Onset Diabetes at Young Age (Mody) More Common in Europe Than Previously Assumed. *Lancet* **345**: 648.

152. Lee, D.Y., J.P. Northrop, M.H. Kuo, and M.R. Stallcup. 2006. Histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a is a transcriptional coactivator for nuclear receptors. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 8476-8485.
153. Lee, J.T., L.S. Davidow, and D. Warshawsky. 1999. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nature Genetics* **21**: 400-404.
154. Lee, T.I., R.G. Jenner, L.A. Boyer, M.G. Guenther, S.S. Levine, R.M. Kumar, B. Chevalier, S.E. Johnstone, M.F. Cole, K. Isono, H. Koseki, T. Fuchikami, K. Abe, H.L. Murray, J.P. Zucker, B.B. Yuan, G.W. Bell, E. Herbolsheimer, N.M. Hannett, K.M. Sun, D.T. Odom, A.P. Otte, T.L. Volkert, D.P. Bartel, D.A. Melton, D.K. Gifford, R. Jaenisch, and R.A. Young. 2006. Control of developmental regulator's by polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**: 301-313.
155. Lee, Y.H., B. Sauer, and F.J. Gonzalez. 1998. Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1 alpha knockout mouse. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 3059-3068.
156. Lehnertz, B., Y. Ueda, A.A.H.A. Derijck, U. Braunschweig, L. Perez-Burgos, S. Kubicek, T.P. Chen, E. Li, T. Jenuwein, and A.H.F.M. Peters. 2003. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Current Biology* **13**: 1192-1200.
157. Lehto, M., T. Tuomi, M.M. Mahtani, E. Widen, C. Forsblom, L. Sarelin, M. Gullstrom, B. Isomaa, M. Lehtovirta, A. Hyrkko, T. Kanninen, M. Orho, S. Manley, R.C. Turner, T. Brettin, A. Kirby, J. Thomas, G. Duyk, E. Lander, M.R. Taskinen, and L. Groop. 1997. Characterization of the MODY3 phenotype - Early-onset diabetes caused by an insulin secretion defect. *Journal of Clinical Investigation* **99**: 582-591.
158. Li, J.X., G. Ning, and S.A. Duncan. 2000. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 alpha. *Genes & Development* **14**: 464-474.
159. Li, Q.L., S. Harju, and K.R. Peterson. 1999. Locus control regions - coming of age at a decade plus. *Trends in Genetics* **15**: 403-408.
160. Litt, M.D., M. Simpson, M. Gaszner, C.D. Allis, and G. Felsenfeld. 2001. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* **293**: 2453-2455.
161. Lo, W.S., R.C. Trievel, J.R. Rojas, L. Duggan, J.Y. Hsu, C.D. Allis, R. Marmorstein, and S.L. Berger. 2000. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Molecular Cell* **5**: 917-926.
162. Macfarlane, W.M., T.M. Frayling, S. Ellard, J.C. Evans, L.I.S. Allen, M.P. Bulman, S. Ayres, M. Shepherd, P. Clark, A. Millward, A. Demaine, T. Wilkin, K. Docherty, and A.T. Hattersley. 1999. Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation* **104**: R33-R39.

163. Maestro, M.A., S.F.Boj, R.F.Luco, C.E.Pierreux, J.Cabedo, J.M.Servitja, M.S.German, G.G.Rousseau, F.P.Lemaigre, and J.Ferrer. 2003. Hnf6 and Tcf2 (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas. *Human Molecular Genetics* **12**: 3307-3314.
164. Malecki, M.T., U.S.Jhala, A.Antonellis, L.Fields, A.Doria, T.Orban, M.Saad, J.H.Warram, M.Montminy, and A.S.Krolewski. 1999. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* **23**: 323-328.
165. Martin, D.G.E., D.E.Grimes, K.Baetz, and L.Howe. 2006. Methylation of histone H3 mediates the association of the NuA3 histone acetyltransferase with chromatin. *Molecular and Cellular Biology* **26**: 3018-3028.
166. Maul, G.G., D.Negorev, P.Bell, and A.M.Ishov. 2000. Properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *Journal of Structural Biology* **129**: 278-287.
167. Mattick JS, Makunin IV. 2006 Non-coding RNA. *Hum Mol Genet.* **15** Spec No 1:R17-29
168. Mendel, D.B. and G.R.Crabtree. 1991. Hnf-1, A Member of A Novel Class of Dimerizing Homeodomain Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 677-680.
169. Mendel, D.B., L.P.Hansen, M.K.Graves, P.B.Conley, and G.R.Crabtree. 1991. Hnf-1-Alpha and Hnf-1-Beta (Vhnf-1) Share Dimerization and Homeo Domains, But Not Activation Domains, and Form Heterodimers In vitro. *Genes & Development* **5**: 1042-1056.
170. Mendel, D.B., P.A.Khavari, P.B.Conley, M.K.Graves, L.P.Hansen, A.Admon, and G.R.Crabtree. 1991. Characterization of A Cofactor That Regulates Dimerization of A Mammalian Homeodomain Protein. *Science* **254**: 1762-1767.
171. Menzel, R., P.J.Kaisaki, I.Rjasanowski, P.Heinke, W.Kerner, and S.Menzel. 1998. A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha (HNF-1 alpha) gene. *Diabetic Medicine* **15**: 816-820.
172. Merckenschlager, M., S.Amoils, E.Roldan, A.Rahemtulla, E.O'Connor, A.G.Fisher, and K.E.Brown. 2004. Centromeric repositioning of coreceptor loci predicts their stable silencing and the CD4/CD8 lineage choice. *Journal of Experimental Medicine* **200**: 1437-1444.
173. Metzger, E., M.Wissmann, N.Yin, J.M.Muller, R.Schneider, A.H.F.M.Peters, T.Gunther, R.Buettner, and R.Schule. 2005. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* **437**: 436-439.
174. Miralles F, Visa N. 2006 Actin in transcription and transcription regulation. *Curr Opin Cell Biol.* **18**: 261-6.

175. Misteli, T. 2000. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *Journal of Cell Science* **113**: 1841-1849.
176. Misteli, T. 2004. Spatial positioning: A new dimension in genome function. *Cell* **119**:153-156
177. Miyazaki, S., E.Yamato, and J.Miyazaki. 2004. Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes* **53**:1030-1037
178. Moser, M., A.Pscherer, C.Roth, J.Becker, G.Mucher, K.Zerres, C.Dixkens, J.Weis, L.GuayWoodford, R.Buettner, and R.Fassler. 1997. Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2 beta. *Genes & Development* **11**:1938-1948.
179. Muller, W.G., D.Rieder, G.Kreth, C.Cremer, Z.Trajanoski, and J.G.McNally. 2004. Generic features of tertiary chromatin structure as detected in natural chromosomes. *Molecular and Cellular Biology* **24**:9359-9370
180. Nakayam, J., J.C.Rice, B.D.Strahl, C.D.Allis, and S.I.S.Grewal. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**: 110-113.
181. Nammo, T., K.Yamagata, R.Hamaoka, Q.Zhu, T.E.Akiyama, F.J.Gonzalez, J.Miyagawa, and Y.Matsuzawa. 2002. Expression profile of MODY3/HNF-1 alpha protein in the developing mouse pancreas. *Diabetologia* **45**: 1142-1153.
182. Naya, F.J., H.P.Huang, Y.H.Qiu, H.Mutoh, F.J.Demayo, A.B.Leiter, and M.J.Tsai. 1997. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. *Genes & Development* **11**: 2323-2334.
183. Ng, H.H., R.M.Xu, Y.Zhang, and K.Struhl. 2002. Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 34655-34657.
184. Nightingale, K.P., L.P.O'Neill, and B.M.Turner. 2006. Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Current Opinion in Genetics & Development* **16**: 125-136.
185. Nishioka, K., S.Chuikov, K.Sarma, H.Erdjument-Bromage, C.D.Allis, P.Tempst, and D.Reinberg. 2002. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes & Development* **16**: 479-489.
186. Odom, D.T., N.Zizlsperger, D.B.Gordon, G.W.Bell, N.J.Rinaldi, H.L.Murray, T.L.Volkert, J.Schreiber, P.A.Rolfe, D.K.Gifford, E.Fraenkel, G.I.Bell, and R.A.Young. 2004. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* **303**: 1378-1381.

187. Orahilly, S., R.S. Spivey, R.R. Holman, Z. Nugent, A. Clark, and R.C. Turner. 1987. Type-II Diabetes of Early Onset - A Distinct Clinical and Genetic Syndrome. *British Medical Journal* **294**: 923-928.
188. Osborne, C.S., L. Chakalova, K.E. Brown, D. Carter, A. Horton, E. Debrand, B. Goyenechea, J.A. Mitchell, S. Lopes, W. Reik, and P. Fraser. 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nature Genetics* **36**: 1065-1071.
189. Ott, M.O., J. Reycampos, S. Cereghini, and M. Yaniv. 1991. Vhnf1 Is Expressed in Epithelial-Cells of Distinct Embryonic Origin During Development and Precedes Hnf1 Expression. *Mechanisms of Development* **36**: 47-58.
190. Owen, K. and A.T. Hattersley. 2001. Maturity-onset diabetes of the young: from clinical description to molecular genetic characterization. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **15**: 309-323.
191. Parada, L.A., P.G. McQueen, and T. Misteli. 2004. Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biology* **5**.
192. Parrizas, M., M.A. Maestro, S.F. Boj, A. Paniagua, R. Casamitjana, R. Gomis, F. Rivera, and J. Ferrer. 2001. Hepatic nuclear factor 1-alpha directs nucleosomal hyperacetylation to its tissue-specific transcriptional targets. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 3234-3243.
193. Pearson, E.R., W.G. Liddell, M. Shepherd, R.J. Corral, and A.T. Hattersley. 2000. Sensitivity to sulphonylureas in patients with hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene mutations: evidence for pharmacogenetics in diabetes. *Diabetic Medicine* **17**: 543-545.
194. Peters, A.H.F.M., S. Kubicek, K. Mechtler, R.J. O'Sullivan, A.A.H.A. Derijck, L. Perez-Burgos, A. Kohimaier, S. Opravil, M. Tachibana, Y. Shinkai, J.H.A. Martens, and T. Jenuwein. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Molecular Cell* **12**: 1577-1589.
195. Pfeifer, G.P., R.L. Tanguay, S.D. Steigerwald, and A.D. Riggs. 1990. In vivo Footprint and Methylation Analysis by Pcr-Aided Genomic Sequencing - Comparison of Active and Inactive X-Chromosomal Dna at the Cpg Island and Promoter of Human Pkg-1. *Genes & Development* **4**: 1277-1287.
196. Plath, K., J. Fang, S.K. Mlynarczyk-Evans, R. Cao, K.A. Worringer, H.B. Wang, C.C. de la Cruz, A.P. Otte, B. Panning, and Y. Zhang. 2003. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* **300**: 131-135.
197. Plath, K., S. Mlynarczyk-Evans, D.A. Nusinow, and B. Panning. 2002. Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.* **36**: 233-278.
198. Pokholok, D.K., C.T. Harbison, S. Levine, M. Cole, N.M. Hannett, T.I. Lee, G.W. Bell, K. Walker, P.A. Rolfe, E. Herbolsheimer, J. Zeitlinger,

- F.Lewitter, D.K.Gifford, and R.A.Young. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* **122**: 517-527.
199. Pontoglio,M., J.Barra, M.Hadchouel, A.Doyen, C.Kress, J.P.Bach, C.Babinet, and M.Yaniv. 1996. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* **84**: 575-585.
200. Pontoglio,M., D.M.Faust, A.Doyen, M.Yaniv, and M.C.Weiss. 1997. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene inactivation impairs chromatin remodeling and demethylation of the phenylalanine hydroxylase gene. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 4948-4956.
201. Pontoglio,M., S.Sreenan, M.Roe, W.Pugh, D.Ostrega, A.Doyen, A.J.Pick, A.Baldwin, G.Velho, P.Froguel, M.Levisetti, S.Bonner-Weir, G.I.Bell, M.Yaniv, and K.S.Polonsky. 1998. Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1 alpha-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* **101**: 2215-2222.
202. Poux,S., B.Horard, C.J.A.Sigrist, and V.Pirrotta. 2002. The *Drosophila* Trithorax protein is a coactivator required to prevent reestablishment of Polycomb silencing. *Development* **129**: 2483-2493.
203. Pruss D, Hayes JJ, Wolffe AP. 1995 Nucleosomal anatomy--where are the histones? *Bioessays*. **17(2)**:161-70. Review.
204. Ptashne, M. and A.Gann. 1997. Transcriptional activation by recruitment. *Nature* **386**:569-577.
205. Raeder,H., S.Johansson, P.I.Holm, I.S.Haldorsen, E.Mas, V.Sbarra, I.Nermoen, S.A.Eide, L.Grevle, L.Bjorkhaug, J.V.Sagen, L.Aksnes, O.Sovik, D.Lombardo, A.Molven, and P.R.Njolstad. 2006. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nature Genetics* **38**: 54-62.
206. Ragozy,T., M.A.Bender, A.Telling, R.Byron, and M.Groudine. 2006. The locus control region is required for association of the murine beta-globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation. *Genes Dev.* **20**: 1447-1457.
207. Ragozy,T., A.Telling, T.Sawado, M.Groudine, and S.T.Kosak. 2003. A genetic analysis of chromosome territory looping: diverse roles for distal regulatory elements. *Chromosome Research* **11**: 513-525.
208. Roopra,A., R.Qazi, B.Schoenike, T.J.Daley, and J.F.Morrison. 2004. Localized domains of g9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Molecular Cell* **14**: 727-738.
209. Roth,S.Y., J.M.Denu, and C.D.Allis. 2001. Histone acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* **70**: 81-120.
210. Rougeulle,C., J.Chaumeil, K.Sarma, C.D.Allis, D.Reinberg, P.Avner, and E.Heard. 2004. Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation

- profiles on the X chromosome. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 5475-5484.
211. Santos-Rosa,H., R.Schneider, A.J.Bannister, J.Sherriff, B.E.Bernstein, N.C.Emre, S.L.Schreiber, J.Mellor, and T.Kouzarides. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**: 407-411.
212. Scaffidi,P. and T.Misteli. 2006. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* **312**: 1059-1063.
213. Schaft,D., A.Roguev, K.M.Kotovic, A.Shevchenko, M.Sarov, A.Shevchenko, K.M.Neugebauer, and A.F.Stewart. 2003. The histone 3 lysine 36 methyltransferase, SET2, is involved in transcriptional elongation. *Nucleic Acids Research* **31**: 2475-2482.
214. Scheer,U. and R.Hock. 1999. Structure and function of the nucleolus. *Current Opinion in Cell Biology* **11**: 385-390.
215. Schotta,G., A.Ebert, R.Dorn, and G.Reuter. 2003. Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **14**: 67-75.
216. Schotta,G., M.Lachner, K.Sarma, A.Ebert, R.Sengupta, G.Reuter, D.Reinberg, and T.Jenuwein. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes & Development* **18**: 1251-1262.
217. Schubeler,D., C.Francastel, D.M.Cimborra, A.Reik, D.I.K.Martin, and M.Groudine. 2000. Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes & Development* **14**: 940-950.
218. Schubeler,D., D.M.MacAlpine, D.Scalzo, C.Wirbelauer, C.Kooperberg, F.van Leeuwen, D.E.Gottschling, L.P.O'Neill, B.M.Turner, J.Delrow, S.P.Bell, and M.Groudine. 2004. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* **18**: 1263-1271.
219. Servitja,J.M. and Ferrer,J. 2004. Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia* **47**: 597-613
220. Shi,Y.J., F.Lan, C.Matson, P.Mulligan, J.R.Whetstine, P.A.Cole, R.A.Casero, and Y.Shi. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear arnine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**: 941-953.
221. Shih,D.Q., M.Bussen, E.Sehayek, J.L.Breslow, and M.Stoffel. 2001. HNF-1 alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Diabetes* **50**: A8.
222. Shih,D.Q., M.Heimesaat, S.Kuwajima, R.Stein, C.V.E.Wright, and M.Stoffel. 2002. Profound defects in pancreatic beta-cell function in mice with combined heterozygous mutations in Pdx-1, Hnf-1 alpha, and Hnf-3 beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 3818-3823.

223. Shih,D.Q., S.Screenan, K.N.Munoz, L.Philipson, M.Pontoglio, M.Yaniv, K.S.Polonsky, and M.Stoffel. 2001. Loss of HNF-1 alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes* **50**: 2472-2480.
224. Shilo,Y. and R.N.Eisenman. 2003. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 13225-13230.
225. Shogren-Knaak, M., H.Ishii, J.M.Sun, M.J.Pazin, J.R.Davie, and C.L.Peterson. 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311:844-847
226. Shopland, L.S., C.R.Lynch, K.A.Peterson, K.Thornton, N.Kepper, J.von Hase, S.Stein, S.Vincent, K.R.Molloy, G.Kreth, C.Cremer, C.J.Bult, and T.P.O'Brien. 2006. Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence. *Journal of Cell Biology* **174**:27-38
227. Silander,K., K.L.Mohlke, L.J.Scott, E.C.Peck, P.Hollstein, A.D.Skol, A.U.Jackson, P.Deloukas, S.Hunt, G.Stavrides, P.S.Chines, M.R.Erdos, N.Narisu, K.N.Conneely, C.Li, T.E.Fingerlin, S.K.Dhanjal, T.T.Valle, R.N.Bergman, J.Tuomilehto, R.M.Watanabe, M.Boehnke, and F.S.Collins. 2004. Genetic variation near the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene predicts susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes* **53**: 1141-1149.
228. Sjolinder M, Bjork P, Soderberg E, Sabri N, Farrants AK, Visa N. 2005 The growing pre-mRNA recruits actin and chromatin-modifying factors to transcriptionally active genes.*Genes Dev.* **19(16)**:1871-84.
229. Soria,B. 2001. In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* **68**: 205-219.
230. Soutoglou,E., G.Papafotiou, N.Katrakili, and I.Talianidis. 2000. Transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor-1 requires synergism between multiple coactivator proteins. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 12515-12520.
231. Soutoglou,E., B.Viollet, M.Vaxillaire, M.Yaniv, M.Pontoglio, and I.Talianidis. 2001a. Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *Embo Journal* **20**: 1984-1992.
232. Soutoglou,E., B.Viollet, M.Vaxillaire, M.Yaniv, M.Pontoglio, and I.Talianidis. 2001b. Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *Embo Journal* **20**: 1984-1992.
233. Spector,D.L. 2001. Nuclear domains. *Journal of Cell Science* **114**: 2891-2893.
234. Stallcup,M.R. 2001. Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene* **20**: 3014-3020.
235. Stoffers,D.A., J.Ferrer, W.L.Clark, and J.F.Habener. 1997. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nature Genetics* **17**: 138-139.

236. Stoffers, D.A., N.T. Zinkin, V. Stanojevic, W.L. Clarke, and J.F. Habener. 1997. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature Genetics* **15**: 106-110.
237. Stoffer, D., B. Fahrenkrog, and U. Aebi. 1999. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Current Opinion in Cell Biology* **11**: 391-401.
238. Strahl, B.D. and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45.
239. Stride, A. and A.T. Hattersley. 2002. Different genes, different diabetes: lessons from maturity-onset diabetes of the young. *Annals of Medicine* **34**: 207-216.
240. Struhl, K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. 1998 *Genes Dev.* **12(5)**:599-606.
241. Su, R.C., K.E. Brown, S. Saaber, A.G. Fisher, M. Merckenschlager, and S.T. Smale. 2004. Dynamic assembly of silent chromatin during thymocyte maturation. *Nat. Genet.* **36**: 502-506.
242. Sund, N.J., M.Z. Vatamaniuk, M. Casey, S.L. Ang, M.A. Magnuson, D.A. Stoffers, F.M. Matschinsky, and K.H. Kaestner. 2001. Tissue-specific deletion of *Foxa2* in pancreatic beta cells results in hyperinsulinemic hypoglycemia. *Genes & Development* **15**:1706-1715
243. Swift, H. 1959. Studies on nuclear fine structure. *Brookhaven Symp. Biol.* **12**: 134-152
244. Tachibana, M., K. Sugimoto, M. Nozaki, J. Ueda, T. Ohta, M. Ohki, M. Fukuda, N. Takeda, H. Niida, H. Kato, and Y. Shinkai. 2002. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & Development* **16**: 1779-1791.
245. Tattersa, R.B. 1974. Mild Familial Diabetes with Dominant Inheritance. *Quarterly Journal of Medicine* **43**: 339-357.
246. Thanos, D. and T. Maniatis. 1995. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* **83**:1091-1100
247. Thorens, B. and G. Waeber. 1993. Glucagon-Like Peptide-I and the Control of Insulin-Secretion in the Normal-State and in Niddm. *Diabetes* **42**: 1219-1225.
248. Thorens, B., M.T. Guillam, F. Beermann, R. Burcelin, and M. Jaquet. 2000. Transgenic reexpression of GLUT1 or GLUT2 in pancreatic beta cells rescues GLUT2-null mice from early death and restores normal glucose-stimulated insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry* **275**:23751-23758.

249. Tian, J.M. and U.Schibler. 1991. Tissue-Specific Expression of the Gene Encoding Hepatocyte Nuclear Factor-I May Involve Hepatocyte Nuclear Factor-Iv. *Genes & Development* **5**: 2225-2234.
250. Tronche, F., F.Ringeisen, M.Blumenfeld, M.Yaniv, and M.Pontoglio. 1997. Analysis of the distribution of binding sites for a tissue-specific transcription factor in the vertebrate genome. *Journal of Molecular Biology* **266**: 231-245.
251. Tronche, F., A.Rollier, I.Bach, M.C.Weiss, and M.Yaniv. 1989. The Rat Albumin Promoter - Cooperation with Upstream Elements Is Required When Binding of Apf/Hnf1 to the Proximal Element Is Partially Impaired by Mutation Or Bacterial Methylation. *Molecular and Cellular Biology* **9**: 4759-4766.
252. Tumber, T., G.Sudlow, and A.S.Belmont. 1999. Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *Journal of Cell Biology* **145**: 1341-1354.
253. Turner, B.M. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**: 285-291.
254. Vakoc, C.R., S.A.Mandat, B.A.Olenchock, and G.A.Blobel. 2005. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Molecular Cell* **19**: 381-391.
255. van Driel, R., P.F.Fransz, and P.J.Verschure. 2003. The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J.Cell Sci.* **116**: 4067-4075.
256. Vaxillaire, M., A.Abderrahman, P.Boutin, B.Bailleul, P.Froguel, M.Yaniv, and M.Pontoglio. 1999. Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 35639-35646.
257. Vazquez, J., A.S.Belmont, and J.W.Sedat. 2001. Multiple regimes of constrained chromosome motion are regulated in the interphase *Drosophila* nucleus. *Current Biology* **11**: 1227-1239.
258. Velho, G. and J.J.Robert. 2002. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): Genetic and clinical characteristics. *Hormone Research* **57**: 29-33.
259. Venter, J.C., M.D.Adams, E.W.Myers, P.W.Li, R.J.Mural, G.G.Sutton, H.O.Smith, M.Yandell, C.A.Evans, R.A.Holt, J.D.Gocayne, P.Amanatides, R.M.Ballew, D.H.Huson, J.R.Wortman, Q.Zhang, C.D.Kodira, X.Q.H.Zheng, L.Chen, M.Skupski, G.Subramanian, P.D.Thomas, J.H.Zhang, G.L.G.Miklos, C.Nelson, S.Broder, A.G.Clark, C.Nadeau, V.A.McKusick, N.Zinder, A.J.Levine, R.J.Roberts, M.Simon, C.Slayman, M.Hunkapiller, R.Bolanos, A.Delcher, I.Dew, D.Fasulo, M.Flanigan, L.Florea, A.Halpern, S.Hannenhalli, S.Kravitz, S.Levy, C.Mobarry, K.Reinert, K.Remington, J.Abu-Threideh, E.Beasley, K.Biddick, V.Bonazzi, R.Brandon, M.Cargill, I.Chandramouliswaran, R.Charlab, K.Chaturvedi, Z.M.Deng, V.Di Francesco, P.Dunn, K.Eilbeck, C.Evangelista, A.E.Gabrielian, W.Gan, W.M.Ge, F.C.Gong, Z.P.Gu, P.Guan, T.J.Heiman,

- M.E.Higgins, R.R.Ji, Z.X.Ke, K.A.Ketchum, Z.W.Lai, Y.D.Lei, Z.Y.Li, J.Y.Li, Y.Liang, X.Y.Lin, F.Lu, G.V.Merkulov, N.Milshina, H.M.Moore, A.K.Naik, V.A.Narayan, B.Neelam, D.Nusskern, D.B.Rusch, S.Salzberg, W.Shao, B.X.Shue, J.T.Sun, Z.Y.Wang, A.H.Wang, X.Wang, J.Wang, M.H.Weil, R.Wides, C.L.Xiao, C.H.Yan, A.Yao, J.Ye, M.Zhan, W.Q.Zhang, H.Y.Zhang, Q.Zhao, L.S.Zheng, F.Zhong, W.Y.Zhong, S.P.C.Zhu, S.Y.Zhao, D.Gilbert, S.Baumhueter, G.Spier, C.Carter, A.Cravchik, T.Woodage, F.Ali, H.J.An, A.Awe, D.Baldwin, H.Baden, M.Barnstead, I.Barrow, K.Beeson, D.Busam, A.Carver, A.Center, M.L.Cheng, L.Curry, S.Danaher, L.Davenport, R.Desilets, S.Dietz, K.Dodson, L.Doup, S.Ferriera, N.Garg, A.Gluecksmann, B.Hart, J.Haynes, C.Haynes, C.Heiner, S.Hladun, D.Hostin, J.Houck, T.Howland, C.Ibegwam, J.Johnson, F.Kalush, L.Kline, S.Koduru, A.Love, F.Mann, D.May, S.McCawley, T.McIntosh, I.McMullen, M.Moy, L.Moy, B.Murphy, K.Nelson, C.Pfannkoch, E.Pratts, V.Puri, H.Qureshi, M.Reardon, R.Rodriguez, Y.H.Rogers, D.Romblad, B.Ruhfel, R.Scott, C.Sitter, M.Smallwood, E.Stewart, R.Strong, E.Suh, R.Thomas, N.N.Tint, S.Tse, C.Vech, G.Wang, J.Wetter, S.Williams, M.Williams, S.Windsor, E.Winn-Deen, K.Wolfe, J.Zaveri, K.Zaveri, J.F.Abril, R.Guigo, M.J.Campbell, K.V.Sjolander, B.Karlak, A.Kejariwal, H.Y.Mi, B.Lazareva, T.Hatton, A.Narechania, K.Diemer, A.Muruganujan, N.Guo, S.Sato, V.Bafna, S.Istrail, R.Lippert, R.Schwartz, B.Walenz, S.Yooseph, D.Allen, A.Basu, J.Baxendale, L.Blick, M.Caminha, J.Carnes-Stine, P.Caulk, Y.H.Chiang, M.Coyne, C.Dahlke, A.D.Mays, M.Dombroski, M.Donnely, D.Ely, S.Esparham, C.Fosler, H.Gire, S.Glanowski, K.Glasser, A.Glodek, M.Gorokhov, K.Graham, B.Gropman, M.Harris, J.Heil, S.Henderson, J.Hoover, D.Jennings, C.Jordan, J.Jordan, J.Kasha, L.Kagan, C.Kraft, A.Levitsky, M.Lewis, X.J.Liu, J.Lopez, D.Ma, W.Majoros, J.McDaniel, S.Murphy, M.Newman, T.Nguyen, N.Nguyen, and M.Nodell. 2001. The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-+.
260. Verschure,P.J., I.van der Kraan, E.M.M.Manders, and R.van Driel. 1999. Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *Journal of Cell Biology* **147**: 13-24.
261. Vionnet,N., M.Stoffel, J.Takeda, K.Yasuda, G.I.Bell, H.Zouali, S.Lesage, G.Velho, F.Iris, P.Passa, P.Froguel, and D.Cohen. 1992. Nonsense Mutation in the Glucokinase Gene Causes Early-Onset Non-Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus. *Nature* **356**: 721-722.
262. Vire,E., C.Brenner, R.Deplus, L.Blanchon, M.Fraga, C.Didelot, L.Morey, A.Van Eynde, D.Bernard, J.M.Vanderwinden, M.Bollen, M.Esteller, L.Di Croce, Y.de Launoit, and F.Fuks. 2006. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **439**: 871-874.
263. Viollet,B., Yaniv,M. and Pontoglio,M. 2001. Embryonic but not posnatal reexpression of hepatocyte nuclear factor1 α (HNF1 α) can reactivate the silent phenylalanine hydroxylase gene in HNF1 α -deficient hepatocytes. *Molecular Cell Biology* **21**:3662-3670
264. Volpe,T.A., C.Kidner, I.M.Hall, G.Teng, S.I.S.Grewal, and R.A.Martienssen. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**: 1833-1837.
265. Volpi,E.V., E.Chevret, T.Jones, R.Vatcheva, J.Williamson, S.Beck, R.D.Campbell, M.Goldsworthy, S.H.Powis, J.Ragoussis, J.Trowsdale, and

- D.Sheer. 2000. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *Journal of Cell Science* **113**: 1565-1576.
266. Wang, J. Wysocka, J. Sayegh, Y.H. Lee, J.R. Perlin, L. Leonelli, L.S. Sonbuchner, C.H. McDonald, C.R. Cook and Y. Dou *et al.* 2004 Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination, *Science* **306** 279-283
267. Wang, H.Y., P. Maechler, K.A. Hagenfeldt, and C.B. Wollheim. 1998. Dominant-negative suppression of HNF-1 alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *Embo Journal* **17**: 6701-6713.
268. Weedon, M.N., K.R. Owen, B. Shields, G. Hitman, M. Walker, M.I. McCarthy, L.D. Love-Gregory, M.A. Permutt, A.T. Hattersley, and T.M. Frayling. 2004. Common variants of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha P2 promoter are associated with type 2 diabetes in the UK population. *Diabetes* **53**: 3002-3006.
269. Weedon, M.N., P.E.H. Schwarz, Y. Horikawa, N. Iwasaki, T. Illig, R. Holle, W. Rathmann, T. Selisko, J. Schulze, K.R. Owen, J. Evans, L.D. Bosque-Plata, G. Hitman, M. Walker, J.C. Levy, M. Sampson, G.I. Bell, M.I. McCarthy, A.T. Hattersley, and T.M. Frayling. 2003. Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility. *American Journal of Human Genetics* **73**: 1208-1212.
270. Wei, Y., L.L. Yu, J. Bowen, M.A. Gorovsky, and C.D. Allis. 1999. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **97**: 99-109.
271. Welsh, M., L. Christmansson, T. Karlsson, S. Sandler, and N. Welsh. 1999. Transgenic mice expressing Shb adaptor protein under the control of rat insulin promoter exhibit altered viability of pancreatic islet cells. *Molecular Medicine* **5**: 169-180.
272. Welters, H.J., S. Senkel, L. Klein-Hitpass, S. Erdmann, H. Thomas, L.W. Harries, E.R. Pearson, C. Bingham, A.T. Hattersley, G.U. Ryffel, and N.G. Morgan. 2006. Conditional expression of hepatocyte nuclear factor-1 beta, the maturity-onset diabetes of the young-5 gene product, influences the viability and functional competence of pancreatic beta-cells. *Journal of Endocrinology* **190**: 171-181.
273. West, A.G., M. Gaszner, and G. Felsenfeld. 2002. Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes & Development* **16**: 271-288.
274. Wijgerde, M., F. Grosveld, and P. Fraser. 1995. Transcription Complex Stability and Chromatin Dynamics In-Vivo. *Nature* **377**: 209-213.
275. Williams RR, Azuara V, Perry P, Sauer S, Dvorkina M, Jorgensen H, Roix J, McQueen P, Misteli T, Merckenschlager M, Fisher AG. 2006 Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus. *J Cell Sci.* **119**: 132-40.

276. Wobser, H., H. Dussmann, D. Kogel, H. Y. Wang, C. Reimertz, C. B. Wollheim, M. M. Byrne, and J. H. M. Prehn. 2002. Dominant-negative suppression of HNF-1 alpha results in mitochondrial dysfunction, INS-1 cell apoptosis, and increased sensitivity to ceramide-, but not to high glucose-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 6413-6421.
277. Wolvetang, E. J., T. J. Wilson, E. Sanij, J. Busciglio, T. Hatzistavrou, A. Seth, P. J. Hertzog, and I. Kola. 2003. ETS2 overexpression in transgenic models and in Down syndrome predisposes to apoptosis via the p53 pathway. *Human Molecular Genetics* **12**: 247-255.
278. Wysocka, J., T. Swigut, T. A. Milne, Y. L. Dou, X. Zhang, A. L. Burlingame, R. G. Roeder, A. H. Brivanlou, and C. D. Allis. 2005. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3K4 methylation and vertebrate development. *Cell* **121**: 859-872.
279. Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, Kauer M, Tackett AJ, Chait BT, Badenhorst P, Wu C, Allis CD. 2006 A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*. **442(7098)**: 86-90
280. Yamada, S., H. Nishigori, H. Onda, T. Utsugi, T. Yanagawa, T. Maruyama, K. Onigata, K. Nagashima, R. Nagai, A. Morikawa, T. Takeuchi, and J. Takeda. 1997. Identification of mutations in the hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 alpha gene in Japanese subjects with IDDM. *Diabetes* **46**: 1643-1647.
281. Yamagata, K., H. Furuta, N. Oda, P. J. Kaisaki, S. Menzel, N. J. Cox, S. S. Fajans, S. Signorini, M. Stoffel, and G. I. Bell. 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* **384**: 458-460.
282. Yamagata, K., T. Nammo, M. Moriwaki, A. Ihara, K. Iizuka, Q. Yang, T. Satoh, M. Li, R. Uenaka, K. Okita, H. Iwahashi, Q. Zhu, Y. Cao, A. Imagawa, Y. Tochino, T. Hanafusa, J. Miyagawa, and Y. Matsuzawa. 2002. Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic beta-cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes. *Diabetes* **51**: 114-123.
283. Yamagata, K., N. Oda, P. J. Kaisaki, S. Menzel, H. Furuta, M. Vaxillaire, L. Southam, R. D. Cox, G. M. Lathrop, V. V. Boriraj, X. N. Chen, N. J. Cox, Y. Oda, H. Yano, M. M. Lebeau, S. Yamada, H. Nishigori, J. Takeda, S. S. Fajans, A. T. Hattersley, N. Iwasaki, T. Hansen, O. Pedersen, K. S. Polonsky, R. C. Turner, G. Velho, J. C. Chevre, P. Froguel, and G. I. Bell. 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* **384**: 455-458.
284. Yamaoka, T., M. Yano, T. Yamada, T. Matsushita, M. Moritani, S. Ii, K. Yoshimoto, J. Hata, and M. Itakura. 2000. Diabetes and pancreatic tumours in transgenic mice expressing Pa x 6. *Diabetologia* **43**: 332-339.
285. Yang, Q., K. Yamagata, K. Fukui, Y. Cao, T. Nammo, H. Iwahashi, H. Y. Wang, I. Matsumura, T. Hanafusa, R. Bucala, C. B. Wollheim, J. Miyagawa, and Y. Matsuzawa. 2002. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha

- modulates pancreatic beta-cell growth by regulating the expression of insulin-like growth factor-1 in INS-1 cells. *Diabetes* **51**: 1785-1792.
286. Zhang, Y. and D.Reinberg. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development* **15**: 2343-2360.
287. Zhang, J., S.Brewer, J.Huang, and T.Williams. 2003. Overexpression of transcription factor AP-2 alpha suppresses mammary gland growth and morphogenesis. *Developmental Biology* 256:127-145
288. Zhu, Q., K.Yamagata, A.Miura, N.Shihara, Y.Horikawa, J.Takeda, J.Miyagawa, and Y.Matsuzawa. 2003. T130I mutation in HNF-4 alpha gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects. *Diabetologia* **46**: 567-573.
289. Zimmet, P. 2001. Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the Doomsday scenario be averted? (Reprinted from *Journal of Internal Medicine*, vol 247, pg 301-310, 2000). *Journal of Internal Medicine* **249**: 17-26.
290. Zimmet, P., K.G.M.M.Alberti, and J.Shaw. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**: 782-787.
291. Zink, D., M.D.Amaral, A.Englmann, S.Lang, L.A.Clarke, C.Rudolph, F.Alt, K.Luther, C.Braz, N.Sadoni, J.Rosenecker, and D.Schindelhauer. 2004. Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *Journal of Cell Biology* **166**: 815-825.



ANEXOS



MATERIAL y MÉTODOS

1. Reactivos Básicos.

DNA, solución de lisis (genotipaje)

5mL Tris 1M, pH 8.0

2.5mL NaCl 5M

1mL SDS 10%

0.5mL EDTA 0.5M, pH 8.0

1mL Proteinasa K (#3115852, Roche)

Completar el volumen con agua destilada hasta 50mL

Podemos tener preparada la solución de lisis como stock, pero solo añadiremos la proteinasa K en el momento de digerir las colas.

Bicarbonato sódico 7%

Disolver 7g de bicarbonato sódico en 100mL de agua

Citrato, tampón 10mM, pH6

Disolver 2.94g de tri-Sodium Citrate-2H₂O en 1000mL de agua destilada

Ajustar el pH a 6 con HCL 37%

Colagenasa P, solución 1mg/mL (Obtención de islotes pancreáticos)

Preparar justo antes de empezar el experimento. Normalmente se preparan 2.5mL de solución por animal y se suele trabajar con 6 animales a la vez.

25mg colagenasa P (#11 213 865 001, Roche)

Completar el volumen con HBBS 1x hasta 25mL.

Mantener en hielo.

Colagenasa tipo I, solución 0.5mg/mL (Obtención de hepatocitos)

Preparar justo antes de empezar el experimento. Se preparan 10mL de solución por animal.

5mg colagenasa tipo I (#C2674, Sigma)

Completar el volumen con HBBS 1x hasta 10mL.

Mantener en hielo.

ChIP, solución de

1.25mL Hepes 1M, pH8.0

150 μ L MgCl₂ 0.5 M

0.5mL KCl 1M

0.5mL NP40 10%

Completar volumen hasta 50mL

Guardar en frío y añadir en el momento de su uso:

1 mM DTT

1x cocktail inhibidor proteasas (Roche)

Chip, solución de lavado bajo en sal

1mL Tris-HCl 1M, pH 8

5mL Tritón X-100 10%

200 μ L EDTA 0.5M, pH 8

1.5mL NaCl 5 M

0.5mL SDS 10%

Chip, solución de lavado alto en sal

1mL Tris-HCl 1M, pH 8

5mL Tritón X-100 10%

200 μ L EDTA 0.5M, pH 8

5mL NaCl 5 M

0.5mL SDS 10%

Chip, solución de lavado con LiCl

0.5mL Tris-HCl 1M, pH 8

5mL NP40 10%

100 μ L EDTA 0.5M, pH 8

12.5mL LiCl 1M

0.5g deoxicolato de sodio (*Sigma, cuidado es irritante*)

Dextran sulfato 66%

Disolver 33g de dextran sulfato (#31403, Fluka) en 50mL de agua destilada

Dejar agitando y con un poco de calor hasta que se disuelva totalmente.

DNA loading buffer 10x

20% Ficoll 400

0.1M Na₂EDTA, pH 8.0

0.25% (p/v) azul bromofenol

0.26% (p/v) xilen cianol

DTT 1M

Disolver 1.545g DTT en 10mL de agua destilada.

Alicuotar y guardar a -20°C.

EDTA 0.5M, pH 8

Disolver 14.61g de EDTA en 70mL de agua destilada.

Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10N para su disolución (aproximadamente 5mL).

Completar el volumen con agua hasta 100mL.

EGTA 0.5M, pH 8

Disolver 19g de EGTA en 70mL de agua destilada.

Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10N para su disolución.

Completar el volumen con agua hasta 100mL.

Elución, solución de (ChIP)

A 4mL de agua destilada, añadir

0.5mL SDS 10%

0.5mL EDTA 0.5M pH 8

Etanol 70%

35mL etanol absoluto

Completar el volumen con agua destilada hasta 50mL

Geles acrilamida 12% (10 geles de 0.75mm de grosor)

15mL acrilamida/bisacrilamida (37.5:1) 40% (#161-0148, Bio-Rad)

15mL acrilamida/bisacrilamida (19.5:1) 40% (#161-0144, Bio-Rad)

10mL TBE 10x

Completar el volumen con agua hasta 100mL

Añadir en el último momento los catalizadores de la polimerización:

420µL APS 10%

54µL TEMED (#161-0800, Bio-Rad)

Geles agarosa

Normalmente los geles se preparan al 1% de agarosa en soluciones de 1xTAE, 1xTBE o 0.5xTBE. Para un gel de 50mL al 1%:

0.5g agarosa (electrophoresis-grade)

50mL 1xTAE, 1xTBE o 0.5xTBE

Llevar a ebullición la solución hasta que la agarosa se haya solubilizado.

Para ver el DNA se puede añadir bromuro de etidio (0.5µg/mL) en el gel.

Agarosa (%)	Rango de resolución de fragmentos líneas de DNA (Kb)
0.5	30 a 1
0.7	12 a 0.8
1.0	10 a 0.5
1.2	7 a 0.4
1.5	3 a 0.2

Glicina 1.25M

Diluir 1.87g de glicina en 20mL de agua destilada.

Guardar a 4°C

HBBS, solución x1 (Obtención de islotes pancreáticos)

10mL HBBS x10 (#14060040, Invitrogen)

0.238g HEPES

Ajustar pH hasta 7.4 con una solución de bicarbonato sódico al 7%

Completar el volumen con agua destilada hasta 100mL.

Guardar a 4°C.

HBBS-BSA, solución x1 (Obtención de islotes pancreáticos)

100mL HBBS x10 (#14060040, Invitrogen)

2.38g HEPES

5g BSA

Ajustar pH hasta 7.4 con una solución de bicarbonato sódico al 7%.

Completar el volumen con agua destilada hasta 1000mL.

Guardar a 4°C.

Hepes 1M, pH 8

Disolver 23.4g de Hepes en agua destilada

Ajustar pH hasta 8 con KOH 5M

Completar el volumen con agua destilada hasta 100mL.

Hibridación, solución de (DNA-inmunoFISH)

2mL formamida

0.4mL SSC x20

0.5mL Cot1 (Invitrogen)

0.6mL dextran sulfato 66%

Alicuotar y guardar a -20°C

Histopaque 1090 (Sigma-Aldrich)

35mL Histopaque 1077 (#10771-500mL)

15mL Histopaque 1019 (#11191-100mL)

KCl 1M

Disolver 3.73g de KCl en 50mL de agua destilada.

En el caso de prepararse como stock para preparar la solución TFBI, hay que filtrar con filtros de 0.22µm.

KOH 5M

Disolver 14g en 50mL de agua destilada

LiCl 1M

Disolver 2.12g LiCl en 50mL de agua destilada

MgCl₂ 1M

Disolver 10.15g de MgCl₂·6H₂O en 50mL de agua destilada.

MOPS·Na 1M

Diluir 5.23g de MOPs en agua bidestilada

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH

Completar el volumen con agua hasta 25mL

Filtrar con filtros de 0.22µm.

Mowiol

Disolver 2.4g de Mowiol 4-88 (#475904, Calbiochem) en 6mL de glicerol y 6mL de agua destilada

Agitar durante 2h a temperatura ambiente

Añadir 2.4mL de Tris-HCl 1M, pH8

Agitar a 50°C hasta la total disolución

Alicuotar y guardar a -20°C

NaCl 5M

Disolver 146g de NaCl en 50mL de agua destilada.

NaHCO₃ 1M

Disolver 2.5g NaHCO₃ en 30mL de agua destilada

NaOH 10N

Disolver 20g de NaOH en 50mL de agua destilada.

Paraformaldehido, solución 4%

Disolver 4g de paraformaldehido en 100mL de PBS 1x, en agitación y con calor sin llegar a hervir.

Una vez disuelto, enfriar la solución hielo.

PBS 10x

80g NaCl

2g KCl

11.5g Na₂HPO₄·7H₂O

2g KH₂PO₄

Ajustar el pH a 6.8

Completar el volumen con agua destilada hasta 1000mL

Perfusión, solución de (Obtención de hepatocitos)

Disolver 9mg de EGTA en 50mL de PBS 1x

Perfusión-BSA, solución de (Obtención de hepatocitos)

9mg de EGTA

0.25g de BSA

Completar volumen hasta 50mL de PBS 1x

Persulfato amónico 10% (APS)

Añadir 1g de persulfato amónico en 10mL de agua destilada.

Guardar a 4°C hasta dos semanas.

PMSF 0.1M

Disolver 0.17g en 10mL de agua destilada

Proteína A/G (Amersham)

Para 1mL de proteína A/G:

0.5mL proteína A + 0.5mL proteína G

Lavar con 1mL de agua destilada

Centrifugar 20seg a 1,000xg

Lavar 2 veces con 1mL de TE 1x

Resuspender con el mismo volumen de TE 1x que ocupe la sefarosa de manera que quede al 50%

Añadir 5 μ L de BSA 10x y 10 μ L de esperma de salmón a 10mg/mL

SDS 10%

Disolver 10g de SDS en 100mL de agua destilada.

El polvo del SDS es muy irritante, así que se recomienda pesar con mascarilla.

Sonicación, solución de

2.5mL Hepes 1M, pH 8

1.4mL NaCl 5M

100 μ L EDTA 0.5M, pH 8

0.5mL SDS 10%

50mg deoxicolato de sodio (Sigma, con cuidado es muy irritante)

Completar volumen hasta 50mL

Guardar a temperatura ambiente porque el SDS precipita

Añadir en el momento de su uso:

1x cocktail inhibidor proteasas (Roche)

SSC x20

175g NaCl

88g Na₃citrato·2H₂O

Ajustar el pH a 7 con 1M HCl

Completar el volumen con agua destilada hasta 1000mL

TAE, solución de electroforesis 50x

121g Tris-base

28.55mL ácido acético glacial

18.6g Na₂EDTA·2H₂O

Completar el volumen con agua destilada hasta 500mL

TBE, solución de electroforesis 10x

54g Tris-base

27.5g ácido bórico

20mL EDTA 0.5M, pH 8.0

Completar el volumen con agua destilada hasta 500mL

TE 1x

0.5 mL Tris-HCl 1M, pH 8.0

0.1 mL EDTA 0.5M, pH 8.0

Completar el volumen con agua destilada hasta 50mL.

Tris-HCl 1M, pH8 o pH6.5

Disolver 12.1g de Tris-base en agua destilada

Enrasar al pH deseado con HCl 37%

Completar el volumen con agua destilada hasta 100mL

2. Ratones.

2.1. Descripción de las colonias utilizadas y de su mantenimiento.

Las colonias de animales utilizadas en este proyecto de tesis fueron mantenidas en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona (UB) con ciclos de luz/oscuridad de 12h y a una temperatura de 21-23°C. A excepción de los experimentos que requerían ayuno, los animales tenían libre acceso a comida y agua.

Se ha trabajado con diferentes colonias de ratón.

La primera de ellas es la colonia de ratones con mutación nula para el gen *Hnf1 α* (*Hnf1 α ^{-/-}*), también conocido como *Tcf1*, generados en el laboratorio del Dr. Frank J Gonzalez (National Institute of Health, Bethesda, USA) en un fondo genético C57Bl/6. Estos ratones tienen deletado el exón 1 de manera que no pueden tener una proteína funcional

Una colonia transgénica de ratones, *Tg^{tet-HNF1 α}* . Un fragmento de 3.17kb de región codificante de *Hnf1 α* fue subclonado en el vector pBI-L (Clontech), bajo el promotor mínimo de CMV y la secuencia enhancer dependiente de tetraciclina (TetO). Los ratones transgénicos *Tg^{tet-HNF1 α}* se obtuvieron por inyección del DNA linealizado sin vector, purificado a partir de gel de agarosa, en oocitos fertilizados en el Instituto Karolinska.

Y por último la línea transgénica *Tg^{RIP-tTA}*, con la expresión del transactivador dependiente de tetraciclina (tTA) bajo el promotor de rata de la insulina II (RIP) en un fondo genético CD1, cedidos por el Dr. William Phillbrick (Yale University School of Medicine, Connecticut, USA). El tTA es inactivo en presencia de tetraciclina.

Los ratones transgénicos se cruzaron con ratones *Hnf1 α ^{+/-}* para obtener ratones *Tg^{RIP-tTA} Hnf1 α ^{+/-}* y *Tg^{tet-HNF1 α} Hnf1 α ^{+/-}* para poder cruzarlos entre sí y obtener dobles transgénicos knock-out para HNF1 α en un fondo genético mixto CD1/C57Bl/6. Se mantuvo el gen tTA reprimido en los animales doble transgénicos mediante la ingesta de comida suplementada con tetraciclina 2.3mg/g (Harlan).

2.2. Genotipaje.

Los ratones fueron genotipados por PCR, a partir del análisis de DNA genómico extraído de la cola de acuerdo con el método descrito en 2. Se utilizaron cebadores que reconocen específicamente cada transgén. Para genotipar los ratones *Tg^{RIP-tTA}* usamos cebadores que reconocen el tTA (tTA.FOR:

CTCACTTTTGGCCCTTTAGAA; tTA.REV: GCTGTACGCGGACCCACTTT). Los ratones $Tg^{\text{tet-HNF1}\alpha}$ se detectaron por amplificación de la región promotora del pBIL y parte del exón1 de *Hnf1 α* (pBIL-HNF1a.FOR: CGGGGATCCTCTAGTCAGC; pBIL-HNF1a.REV: CTCTTTGCTCAGGCCAGACT). Los ratones *Hnf1 α ^{-/-}* se genotiparon con el uso de tres cebadores (HNF1a_promotor: TTGCAAGGCTGAAGTCCAAAGT, HNF1a_exón1: CCATTAGGCAACTCGGTCAGG y HNF1a_intrón1: AGGCCCCCTAGA CGGGAAGTG), de manera que el DNA de un ratón *Hnf1 α ^{+/+}* amplifica 2 bandas de 723bp (promotor-intron) y 491bp (promotor-exon), a diferencia del ratón *Hnf1 α ^{-/-}* que al no tener el exón 1, sólo puede amplificar una banda más corta de 203bp (promotor-intron).

2.3. Protocolo de extracción de DNA a partir de cola de ratón para genotipaje.

Con este protocolo se obtiene DNA a partir de colas de ratón para su genotipaje. En este protocolo hay una pequeña modificación en el caso de que el DNA sea utilizado para realizar southern, ya que para esta técnica se necesita un DNA de mejor calidad.

La formulación de los reactivos necesarios para este protocolo está en el apartado **Reactivos Básicos** de este capítulo.

1. En el momento del destete de los animales, además de asignarles una numeración, se corta la punta de la cola para extraer DNA y se guardan en tubos de 0.5 mL (*ependorf*) con el número asignado a cada ratón.
Si se hace la extracción de DNA el mismo día que se obtienen las colas, se guardan a 4°C hasta que se añade la solución de lisis, si no se guarda a -20°C. En el caso de querer hacer southern con estas colas es preferible empezar la lisis el mismo día antes que congelarlas.
2. Añadir 0.5mL de solución de lisis de DNA en cada *ependorf* e incubar las muestras a 56°C toda la noche (*o/n*).
3. Centrifugar las muestras a 10,000 rpm durante 10 minutos.
El objetivo es limpiar el sobrenadante, con el DNA, de pelos y restos de tejido no digerido.
4. Recuperar el sobrenadante de cada *ependorf* y pasarlo a uno nuevo.

5. **(opcional para southern)** Añadir un volumen de una solución fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1) y agitar vigorosamente. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos y recuperar la fase acuosa, la cual se pasa a un nuevo *eppendorf*.
6. Añadir un volumen de isopropanol 100% e ir agitando suavemente los tubos hasta identificar la hebra de DNA.
7. Una vez identificada la madeja de DNA, recuperarla con una punta amarilla y pasarla a un *eppendorf* nuevo donde habrán 750 μ L de etanol 70%
8. Centrifugar las muestras a 10,000 rpm durante 5 minutos.
9. Eliminar el sobrenadante y dejar secar los precipitados (*pellets*) de DNA
Es importante que no queden restos de alcohol, por lo que se elimina el sobrenadante muy poco a poco para que no queden restos de etanol en las paredes. Se sabrá que el pellet se ha secado porque desaparece el color blanco inicial.
10. Añadir 100 μ L de agua destilada o Tris 10mM, pH 8.5 y poner las muestras en el baño a 55 $^{\circ}$ C un par de horas mínimo, para favorecer la resuspensión del DNA. Guardar las muestras a 4 $^{\circ}$ C.
Es importante que el pellet esté bien resuspendido, se puede añadir más agua o Tris para mejorar la resuspensión.

2.4. Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT)

Los ratones adultos (6-8 semanas de vida) se ayunan durante mínimo 5hr antes del test. Se inyecta intraperitonealmente 2mg de glucosa / g de peso del animal. Se extrae sangre venosa a partir de la cola a 0, 15, 60 y 120 minutos a partir de la inyección de glucosa. Se analiza la glicemia con el medidor de glucosa Accutrend Sensor (Roche).

3. Preparación y análisis de RNA y de DNA.

3.1. Protocolo de obtención de RNA a partir de tejidos de ratón.

Cuando se trata de obtener RNA de tejido –páncreas, hígado, riñón, duodeno o bazo- 50mg de dicho tejido son extraídos del animal y homogenizados rápidamente en 1mL de TRIZOL® (#15596-018, Invitrogen) con la ayuda de un homogenizador (POLYTRON®, Suiza).

En el caso de los islotes o tejido acinar, se utiliza 0.5mL de TRIZOL® por cada 200-500 islotes o una cantidad comparable de acinar. En ambos casos se disgrega el material con la ayuda de un vórtex vigoroso con el fin de conseguir una homogenización rápida del tejido.

En el caso de un cultivo celular, placas confluentes de 60 mm² se lavan previamente 3 veces con PBS 1x a 4°C y a continuación se añade 1mL de TRIZOL® por placa.

En algunos casos es imposible realizar la extracción del RNA en el mismo momento que es extraído el tejido; en estos casos se guardan las muestras un máximo de 24 horas en RNAlater® (# 7020, Ambion). Se pasa el tejido a 1 mL de TRIZOL® para la homogenización.

Es muy importante extraer los tejidos con la mayor rapidez posible y mantener todo el material en hielo, para evitar al máximo la actuación de las RNAsas endógenas. Las centrifugaciones también han de realizarse a 4°C a fin de evitar al máximo la degradación del RNA. Todo el material de plástico ha de ser libre de RNAsas y hay que trabajar con guantes.

Otros materiales como pinzas, cubetas de electroforesis, Erlen Meyers se tratan con una solución de NaOH 0.3M (12gr NaOH en 1L de agua destilada libre de RNAsas) durante 10 minutos y luego se aclaran con agua libre de RNAsas, para inactivar las posibles RNAsas presentes.

1. En todos los casos, incubar el homogenado de TRIZOL® 5 minutos a temperatura ambiente para favorecer la disociación de los complejos nucleoproteicos.

A partir de ahora todas los volúmenes descritos están referidos a 1mL de TRIZOL®

2. Añadir 200µL de cloroformo (#25690, Fluka) y agitar los tubos vigorosamente durante 15 segundos. Reposar las muestras durante 3 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 1200xg durante 15 minutos a 4°C.

3. Recuperar la fase acuosa tras la centrifugación, que es la capa superior y la que contiene el RNA y transferir a un tubo *eppendorf* de 1.5mL libre de RNAsas. Añadir 500 μ L de isopropanol (# 59304, Fluka) e incubar 10 minutos a temperatura ambiente para precipitar el RNA.
4. *En el caso de partir de poco material, como es el caso de los islotes o tejido acinar, utilizar 1 μ L de glicógeno (#10814-010, Invitrogen) como carrier.*
5. Centrifugar a 1200xg durante 10 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante y añadir 1mL de etanol (#141086, Panreck) al 75% para limpiar los *pellets*. Centrifugar a 7500xg durante 5 minutos.
6. Descartar el sobrenadante y dejar secar los *pellets* de RNA hasta que desaparezca la totalidad del etanol y los *pellets* sean incoloros.
El exceso de secado dificulta la resuspensión del RNA.
7. Resuspender las muestras en agua libre de RNAsas. Dejar las muestras 1h en hielo para permitir la resuspensión del RNA. Alicuotar las muestras y guardar a -80°C.
El volumen suele variar dependiendo del tamaño del pellet pero es importante añadir suficiente agua para permitir la total resuspensión de éste. En el caso de islotes se suele resuspender en 10 μ L.
8. Con una de las alícuotas se valora la concentración del RNA con un espectrofotómetro a partir de la absorbancia a 260nm.
Para comprobar la integridad del RNA se cargan 500ng de cada muestra en un gel de agarosa 1%
Todo el material necesario para realizar el gel, además de las cubetas de electroforesis, peines y cama se han tratado previamente con una solución NaOH 0.3M. La agarosa y los tampones son también libres de RNAsas.

3.2. Protocolo de RT (Reacción de la Transcriptasa Reversa).

Esta reacción consiste en la transformación de las moléculas de RNA a moléculas de DNA monocatenarias complementarias en secuencia (DNAC) que más adelante son utilizadas como muestra para amplificar en reacciones de PCR secuencias concretas de genes, a fin de conocer los niveles de expresión de los mismos.

Para la transcripción reversa (RT) se utilizan entre 200ng y 1µg de RNA total, dependiendo de la disponibilidad. Este protocolo utiliza la transcriptasa reversa SuperScriptII (#18064, Invitrogen).

Se sigue trabajando con RNA, así que es muy importante trabajar con eppendorfs y puntas libres de RNAsas, además de seguir utilizando guantes.

1. Descongelar los RNAs en hielo.
2. Para cada muestra, mezclar el RNA total con 2µL de *random primers* (100pmol/µL) y añadir agua destilada libre de RNAsas hasta alcanzar un volumen final de 8µL.

Los random primers son cebadores con secuencia aleatoria de 6-mer de tamaño, de manera que permiten la transcripción inversa de toda la población de RNAs presentes en la muestra. También se puede usar como cebador Oligo(dT) (1 µL (500µg/ml)) el cual permite pasar a DNAC preferentemente la población de RNAs mensajeros.

3. Colocar las muestras en un termociclador (PTC-100, MJ Research) e incubarlas a 70°C durante 10 minutos y a 25°C otros 10 minutos.

La incubación a 70°C desnaturaliza el RNA y la incubación a 25°C es necesaria para que los random primers puedan hibridar con el RNA total; en el caso de usar oligo(dT) no es necesaria esta última incubación.

4. Mientras se incuban las muestras, preparar la mezcla. Estas condiciones son para una única muestra:

4µL	5X First-Strand Buffer
2µL	0.1M DTT
5µL	2mM dNTP mix
	(solución de 10mM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP)
1µL	SuperScript™ II

Hay que preparar una mezcla paralela sin SuperScript™ II para los controles negativos de la transcripción inversa. Si se detecta amplificación de banda en las posteriores PCRs será indicativo que existe una contaminación de DNA genómico. Tal como se comenta más adelante, es también esencial diseñar cebadores que abarquen una región intrónica para cerciorarse que el producto amplificado no corresponde a pequeñas cantidades de material genómico. No obstante es importante el control sin transcriptasa porque la presencia de DNA genómico en cantidades variables en diferentes muestras puede competir y afectar de forma diferencial la eficiencia de amplificación de transcritos poco abundantes.

5. Antes de que termine la incubación a 25°C añadir la mezcla (12µL) y mezclarla con la muestra pipeteando con mucho cuidado.

6. Incubar las muestras en el termociclador a 42°C 50 minutos, 47°C 10 minutos, 52°C 10 minutos, 97°C 10 minutos y 4°C indefinido.

42°C es la temperatura óptima de la SuperScript™II para sintetizar DNAc; las incubaciones a 47°C y 52°C se realizan para deshacer posibles estructuras del RNA debidas a complementariedad de secuencia y facilitar la actividad de la transcriptasa. A 97°C se inactiva el enzima.

7. Alicuotar las muestras y guardar a -20°C.

Las moléculas de DNAc son muy inestables, así que es recomendable descongelar las muestras no más de dos veces y mantenerlas siempre en hielo cuando no estén en el congelador.

3.3. Protocolo de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

En el caso de analizar por PCR el nivel de expresión de genes, los cebadores se han diseñado de manera que el producto expanda un intrón; de esta manera se elimina la posibilidad de considerar señal de contaminación genómica como señal de expresión génica.

En algunos casos se han co-amplificado controles internos (β -actina, TBP o HPRT) junto con el gen de interés. En las reacciones de PCR semi-cuantitativas los productos de PCR se analizaron a dos ciclos distintos para asegurar que ambos productos estén en fase exponencial de amplificación. La mayoría de datos se han validado contrastando al menos cinco animales control y 5 animales mutados.

Para evitar contaminaciones, montar y analizar la reacción de PCR en un lugar y con pipetas diferentes.

Preparar la mezcla y establecer la reacción. Estas condiciones son para una única muestra:

2 μ L	10x PCR buffer
2 μ L	2mM dNTPs (Attendbio)
1 μ L	10pmol/ μ L primer.FOR (Isogen)
1 μ L	10pmol/ μ L primer.REV (Isogen)
0.1 μ L	5U/ μ L Taq polimerasa (BioTools)
1 μ L	muestra DNAC (diluir 1/5-1/10 en función de la abundancia del transcrito amplificado)
	agua destilada hasta 20 μ L

Condiciones de PCR:

94°C 3 minutos

Durante unos 28-30 ciclos (el número de ciclos varía dependiendo de la eficiencia del ensayo y la abundancia del transcrito analizado):

94°C 30 segundos (desnaturalización)

58°C-64°C 30 segundos (hibridación)

72°C 30-45 segundos (extensión)

Terminados los ciclos,

72°C 5 min

4°C 10 min

Si se desea obtener información semicuantitativa se extraen 10 μ l entre 2 y 4 ciclos antes de completar la reacción para analizar la amplificación en fase exponencial

Comprobar los productos de PCR para cada muestra y cada pareja de cebadores corriéndolos en geles de acrilamida del 12% (TBE 1x) a 140V durante 2 horas-2 horas 30 minutos, dependiendo del tamaño de las bandas. Teñir los geles en agua con 2 μ L de bromuro de etidio (100mg/mL) durante unos segundos. Realizar la fotografía del gel.

Es importante no saturar la señal de las bandas detectadas con largas exposiciones para poder observar las diferencias existentes entre las distintas muestras.

Podrían correrse las muestras en geles de agarosa 2%, pero los geles de acrilamida son más sensibles, lo cual facilita el análisis a ciclos más bajos, y más resolutivos en el caso de co-amplificaciones de productos de PCR con tamaños parecidos.

3.4. Protocolo de PCR a tiempo real con SYBR green.

Se siguen los mismos principios y precauciones que para la PCR, salvo alguna particularidad.

El sistema de detección de la amplificación del DNA utilizado es el fluorocromo SYBR green que se intercala en la doble cadena de DNA, permitiendo la detección y cuantificación del aumento de DNA a cada ciclo de polimerización.

Usamos el termociclador y sistema de detección iCycler de Bio-Rad. Se trabaja con placas de PCR y el film sellador tiene que ser óptico (#2239444, Bio-Rad) y no debe tocarse nunca con los guantes.

Se trabaja siempre con duplicados para una mayor reproducibilidad de la cuantificación.

Mezcla de PCR para un pozo:

10 μ L de SYBR green Real time PCR buffer 2x (#S-4438, Sigma)

0.4 μ L cebador FOR

0.4 μ L cebador REV

1.5 μ L muestra

agua destilada hasta 20 μ L

Condiciones de PCR:

Como una PCR convencional, salvo que se busca la saturación de la PCR realizando 40 ciclos y se añade a cada ciclo un paso de lectura del DNA que dependerá de cada producto de PCR.

La cantidad de cebador utilizada dependerá de la cantidad de uniones inespecíficas cebador-cebador (*primer dimers*) que se den en la reacción y que puedan interferir en la lectura de la PCR. Esto se determina en reacciones piloto analizadas con electroforesis convencional. La concentración de cebador idónea será aquella que permita una amplificación específica, con un mínimo de formación de dímeros de cebadores, y con una eficiencia cercana al 100%. La temperatura de lectura se establecerá realizando una curva de desnaturalización (*melting curve*). La curva de desnaturalización se determina mediante el aumento progresivo de la temperatura que conlleva la pérdida progresiva de fluorescencia por desnaturalización de los productos de PCR. Esta temperatura tiende a ser diferente para cada secuencia de DNA de doble cadena. Si sólo hay un producto de PCR, el resultado final será un único pico. Si existen dímeros inespecíficos de cebador, se verán 2 picos, uno para los dímeros y otro para el

producto PCR. La temperatura de lectura será aquella que desnaturalice los dímeros pero no el producto PCR.

Análisis semi-cuantitativo por PCR a tiempo real

El principio de la PCR a tiempo real es otorgar a las muestras problema valores relativos a una curva patrón, hecha a partir de una dilución seriada de una muestra conocida. Este patrón permitirá valorar la eficiencia de la PCR, su reproducibilidad y otorgar valores semi-cuantitativos a las muestras a analizar.

Los valores se deducen a partir del ciclo de PCR a partir del cual la reacción de PCR empieza su fase exponencial (Ct) siguiendo la relación:

$$SQ = (1+eff)^{Ct}$$

SQ= cantidad inicial de producto

Eff= porcentaje de eficiencia de PCR

Ct= ciclo de PCR a partir del cual empieza la fase exponencial

Siempre se referencia los datos a un gen control, en el caso de valorar expresión génica mediante RT-PCR; o al porcentaje de *input* de cromatina en el caso de una ChIP (ver más adelante Protocolo de Inmunoprecipitación de cromatina, ChIP)

4. Análisis de proteínas.

4.1. Preparación de muestras para inmunofluorescencia.

Las muestras que se han preparado para hacer bloques de parafina han sido varios tejidos de animales adultos (páncreas, hígado, duodeno, riñón y bazo), embriones completos de edades comprendidas entre día embrionario (E) E13.5 y E15.5 y páncreas diseccionado de embriones de E18.5. La única diferencia a lo largo del protocolo son los tiempos de fijación en paraformaldehido, que en el caso de los tejidos adultos y de los embriones E15.5 y E18.5 es de una noche y de no más de 3 horas en el caso de los embriones E13.5.

Las muestras parafinadas pueden utilizarse para inmunofluorescencia o para hibridaciones in situ, así que si se quiere aprovechar el bloque para las dos técnicas es importante que todas las soluciones se preparen con reactivos libres de RNAsas.

1. Antes de extraer los tejidos del animal o los embriones de la madre preparar el paraformaldehido (Fluka) al 4% en PBS 1x calentando a 85°C y dejar enfriando.

Para poder disolver el paraformaldehido hay que calentarlo mientras se agita. Importante sellar el Erlen Meyer con papel de plata y Parafilm para evitar los vapores irritantes.

2. Obtener el tejido para analizar por inmunofluorescencia y fijarlo en paraformaldehido a 4°C el tiempo requerido.

En el caso de hacer bloques congelados:

3. Lavar el tejido 3 veces en PBS 1x
4. Dejar toda una noche a 4°C en PBS 1x-20% sacarosa para crioproteger el tejido.
5. Lavar en PBS 1x.
6. Incluir el tejido en O.C.T. compound (#4583, Tissue-Tek, Bayer) en nieve carbónica y guardar a -80°C.

En el caso de hacer bloques de parafina: _____

3. Deshidratar el tejido en un banco de diluciones creciente de etanol a temperatura ambiente:

3 incubaciones de 15min en etanol 50%

3 incubaciones de 15min en etanol 70%

Se puede guardar el tejido en etanol 70% durante aproximadamente una semana a temperatura ambiente o a 4°C

3 incubaciones de 15 min en etanol 95%

3 incubaciones de 15 min en etanol absoluto
parafinar

4.2. Protocolo de inmunofluorescencia.

a) Bloques de Congelado.

1. Cortar en un criostato secciones de 5-7 μ m. Se recoge el tejido por leve contacto con el portaobjetos previamente polilisinado (Sigma). Dejar secar el tejido unos 15min a temperatura ambiente.

Guardar las secciones a -80°C hasta su uso.

2. Antes de la inmunofluorescencia, descongelar las secciones unos 20min a temperatura ambiente y rehidratar las muestras 5min en PBS 1x.

3. Proceder al punto nº 5 del protocolo de **Bloques de Parafina**

b) Bloques de Parafina

1. Cortar en un micrótopo secciones de 3 μ m. Depositar las secciones finas en un baño a 45°C para que se alisen y pescar con un porta previamente polilisinado.

2. Dejar secar las muestras a 37°C mínimo 1-2h.

Es mejor cortar el mismo día que se empezará la inmunofluorescencia o de un día para otro

3. Desparafinar y rehidratar:

- a. Colocar las preparaciones en posición horizontal en un cestillo para una cubeta de cristal de 200 mL.
- b. Realizar 2 baños de 15min en xilol 100% a temperatura ambiente
- c. Quitar el exceso de líquido y hacer lavados consecutivos de 5 min en un banco de diluciones decreciente de etanoles (etanol absoluto, etanol 95% y etanol 70%)

4. Eliminar el exceso de líquido y lavar rápidamente en agua destilada para quitar el exceso de etanol.

En caso necesario se pueden mantener las preparaciones rehidratadas en PBS 1x a 2-8 °C hasta 18 h.

5. Calentar en cubeta de plástico las muestras 2x5min en el microondas a máxima potencia en tampón citrato 10mM, pH6 para desenmascarar los epítomos.

6. Dejar enfriar unos minutos y traspasar las preparaciones de la cubeta de plástico a otra de vidrio con PBS 1x lo más rápido posible para evitar que el tejido se despegue del porta-objetos.
7. Permeabilizar las muestras mínimo 30 min en PBST-1% Tritón a temperatura ambiente.
8. Lavar el exceso de detergente en PBS 1x 5 min a temperatura ambiente.
9. Secar el portaobjetos con papel de celulosa bordeando el tejido y delimitar el tejido con un rotulador hidrófobo (DAKO pen) que permitirá ahorrar solución de anticuerpo a la hora de incubar las muestras (#S2020, DAKOCytomation)
No permitir que se seque el tejido, aumentaría la señal de fondo inespecífica.
10. Bloquear el tejido mínimo 30 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda en una solución bloqueante DAKO (#S3022, DakoCytomation) enriquecida con 3% de suero normal de la especie de donde proviene el anticuerpo secundario.
Usar 50 μ l si se dispone del rotulador hidrófobo DAKO o 150 μ l y cubrir con un trozo de parafilm sin hacer burbujas para evitar evaporaciones
11. Eliminar el exceso de solución bloqueante, sacudiendo con cuidado los porta-objetos encima de un papel absorbente.
12. Incubar el tejido con una dilución adecuada de anticuerpo primario en solución bloqueante, toda la noche a 4 °C en una cámara húmeda que cierre bien.
Sobretudo es importante que no se sequen las muestras o la inmunofluorescencia quedará muy sucia.
No diluir un suero no purificado menos de 1:100 porque da mucho fondo. Los monoclonales se suelen diluir 1:50.

13. Sacudir los portas con cuidado encima de un papel absorbente y lavar 5 min a temperatura ambiente con PBS, PBST-0.2% Tritón y PBS.
14. Incubar el anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo diluido en solución de bloqueo unos 45min-2h a temperatura ambiente, en la cámara húmeda y en la **oscuridad**
Los secundarios conjugados a FITC, Cy2 o Cy3 se diluyen 1:200 y los conjugados a AlexaFluor 466 o 543 1:500.
A partir de ahora se protegerá de la luz las muestras en todo momento ya que los fluorocromos son extremadamente sensibles a la luz.
15. Sacudir los portas con cuidado encima de un papel absorbente y lavar 5 min a temperatura ambiente con PBS, PBST-0.2% Tritón y PBS.
16. Secar bien los bordes del porta y montar en Mowiol o con Prolong Antifade (#P7481, Amersham) para una mejor protección del fluorocromo.
Colocar el cubre-objetos contra el borde del porta-objetos y dejar caer suavemente acompañando con los dedos sin hacer burbujas.
17. Guardar en una caja negra y analizar en un microscopio de fluorescencia.

4.3. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

1. Hacer un lavado de PBS 1x a las células, hepatocitos o islotes a inmunoprecipitar. Se recomienda trabajar con 10^6 células por ChIP.
2. Centrifugar 1min a 1,000 rpm a 4°C
3. Resuspender las células en 10mL de PBS 1x y añadir 0.3mL de formaldehído 36% de manera que quede al 1%.
4. Fijar la cromatina 5-15 min a temperatura ambiente en rotación *Dependiendo de la proteína a precipitar, puede requerir una mayor fijación aumentando el tiempo o la temperatura. Un exceso de fijación puede reducir la eficiencia de precipitación del anticuerpo y afectar la eficiencia de la sonicación.*
5. Detener la fijación con glicina 125mM en frío.
6. Centrifugar 2 min a 2,500 rpm a 4°C
7. Hacer 2 lavados de 20mL con PBS 1x frío.
8. Resuspender en un volumen adecuado de solución de ChIP completo (1mL / 10^6 células) e incubar 10min en hielo. Ir agitando cada 2 min. El objetivo de este paso es llevar a cabo la extracción de los núcleos .
9. Distribuir en tubos *ependorf* de 1.5mL y centrifugar 10 min 10,000 rpm a 4°C.
10. Eliminar el sobrenadante sin apurar. Juntar todos los *pellets* en un mismo tubo y homogenizar suavemente unas 20 veces con un homogenizador manual adaptado para tubos *ependorf*.
11. Centrifugar 10 min 10.000 rpm a 4°C para quitar el exceso de líquido.
12. Resuspender los núcleos en un 1mL de solución de sonicación completa fría.

13. Sonicar el lisado para fragmentar el DNA generando fragmentos de entre 0.5-1.0 Kb.
Es importante no hacer espuma para una buena sonicación. Sonicar con la muestra en hielo y esperar 1min entre pulso y pulso. La punta del sonicador no debe tocar las paredes del tubo y debe introducirse hasta el cono del tubo eppendorf. Subir y bajar la potencia del sonicador progresivamente hasta el máximo permitido. Sonicar 9 pulsos de 20seg
14. Centrifugar la muestra a máxima velocidad mínimo 30min a 4°C.
15. Mientras tanto se puede preparar la proteína A/G siguiendo el protocolo especificado en Reactivos Básicos.
16. Añadir 1% Tritón y diluir el sonicado con solución de sonicado+1% Tritón de manera que quede a 0.75 mL por inmunoprecipitación (IP).
17. Hacer un preaclorado incubando la cromatina sonicada con 80 µl de Protein A/G por IP, mínimo 4 h a 4°C en rotación continua
La finalidad es arrastrar cualquier unión inespecífica de la cromatina a la proteína A/G
18. Centrifugar 2 min a 3,000 rpm a 4°C.
19. Recoger el sobrenadante sin apurar y distribuir a partes iguales (unos 750µL) en tubos de 1,5mL según el número de IPs a realizar.
En este punto es importante recoger 75µL de cromatina sonicada que corresponderá al 10% de input, es decir la cromatina total no precipitada que nos servirá de referencia para tener una idea cuantitativa del grado de precipitación de una secuencia génica determinada.
Es importante reservar una condición como control negativo, en el que se usará para precipitar suero pre-inmune o un anticuerpo no relacionado como anti-IgG de ratón.
20. Incubar la cromatina con 1-5 µg de anticuerpo a 4°C toda la noche en rotación.

En el caso de usar un anticuerpo de origen de ratón, al día siguiente se incubará durante 2h la cromatina con un anticuerpo puente anti-IgG de ratón de origen de conejo para aumentar la eficiencia de precipitación con la proteína A/G.

21. Añadir 40 μ l de Protein A/G a cada IP. Continuar la incubación 1h-1h30 a 4°C en rotación.
A más tiempo incubando, más unión inespecífica de la cromatina a la proteína A/G.
22. Centrifugar 0.5 min a 3,000 rpm a 4°C y descartar los sn.
23. Lavar las muestras con 1 mL de solución de lavado bajo en sal durante 5 min en rotación.
La temperatura dependerá de la proteína a precipitar. Si es muy sensible a la degradación, como ciertos factores de transcripción, lavar a 4°C. Si no es preferible a temperatura ambiente porque es más específico.
24. Centrifugar 0.5 min a 3,000 rpm a 4°C y descartar los sn.
25. Lavar las muestras con 1 mL de solución de lavado alto en sal durante 5 min en rotación.
La concentración de sal (NaCl) podrá variar según el anticuerpo. A más sal mayor especificidad
26. Centrifugar 0.5 min a 3,000 rpm a 4°C y descartar los sn.
27. Lavar las muestras con 1 mL de solución de lavado con LiCl durante 5 min en rotación.
28. Centrifugar 0.5 min a 3,000 rpm a 4°C y descartar los sn.
29. Lavar 3 veces las muestras con 1mL de TE1x durante 3 min en rotación.
30. Centrifugar 0.5 min a 3,000 rpm a 4°C y descartar los sobrenadantes.
En la última centrifugación apurar bien.

31. Eluir los complejos inmunes añadiendo a cada muestra 200 μ L de solución de elución. Incubar 15 min en rotación a temperatura ambiente. Vortexear para ayudar a la elución.
32. Centrifugar las muestras 2min a 10,000 rpm
33. Recuperar los sobrenadantes
34. Añadir otros 200 μ L de solución de elución a la proteína A/G y volver a incubar otros 15min en rotación.
35. Centrifugar las muestras 2min a 10,000 rpm
36. Recuperar los sobrenadantes y sumarlos a los otros 200 μ L
37. Añadir 16 μ L de NaCl 5M a los 400 μ L de muestra y al 10% de *input*.
38. Revertir la fijación (cross-linking) incubando a 65°C de 6hr a toda la noche.
39. Añadir 1mL de etanol absoluto y precipitar el DNA mínimo 2h a -20°C.
40. Centrifugar 10min a máxima velocidad y resuspender en 100 μ L de agua.
41. Añadir a los 100 μ L de muestra, 2 μ L de EDTA 0.5M, pH 8, 4 μ L Tris 1M, pH 6.5 y 2 μ L de proteinasa K (10 mg/mL). Digerir a 45°C 1-2h.
42. Purificar el DNA con el kit de purificación Qiaquick de Qiagen.
43. El análisis de las muestras se llevará a cabo por PCR empleando cebadores que reconozcan las regiones de DNA de interés, como por ejemplo los promotores. Es necesario amplificar así mismo controles negativos (secuencias de promotores a las que no se espera que el factor se halle unido), y si es posible controles positivos.
Correr una muestra de DNA del 10% de *input* en un gel de agarosa 1% para valorar el tamaño medio de sonicación.

5. DNA Inmuno-FISH.

1. Centrifugar mediante *Cytospin* 50,000 hepatocitos o unos 100 islotes previamente tripsinizados sobre un porta poli-lisinado a 500rpm durante 3min.

Es importante preservar el máximo posible la estructura 3D de los núcleos, así que se trabaja con rapidez y a bajas revoluciones. Los islotes se tripsinizan más o menos 1 min bajo lupa en 1 mL de tripsina precalentada a 37°C y con un suave pipeteo. No se busca la disgregación completa del islote porque dañaría la estructura nuclear.

2. Dejar secar las células en el porta y rehidratar en PBS 1x durante 2 min
3. Fijar en PAF 4%-PBS 1x durante 15 min a temperatura ambiente
Se ha visto que mayores tiempos de fijación pueden afectar el tamaño del punto FISH y por lo tanto la resolución de la técnica
4. Lavar 5 min en PBS 1x para quitar el exceso de paraformaldehido
5. Calentar 5 min en tampón citrato 10mM, pH 6 en el microondas a máxima potencia
Este paso no sólo libera los epítomos, mejorando la inmunofluorescencia en algunos casos, sino que también desnaturaliza el DNA, mejorando el resultado de la FISH
6. Lavar 5 min en PBS 1x
7. Permeabilizar 30 minutos en PBS-Tritón 1% a temperatura ambiente
8. Lavar 5 min en PBS 1x
9. Bloquear mínimo 30 min a temperatura ambiente con diluyente DAKO suplementado con 3% de suero del mismo animal de donde provengan los anticuerpos secundarios
10. Incubar con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo según convenga, en una cámara húmeda a 4°C durante toda la noche.

11. Lavar secuencialmente 5 min cada vez en PBS 1x, PBS-Tritón 0.2% y PBS 1x
12. Incubar 1h-2h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo según convenga.
El anticuerpo secundario lleva conjugado un fluorocromo. A partir de ahora se protegen las muestras de la luz para no dañar los fluorocromos
13. Lavar secuencialmente 5 min cada vez en PBS 1x, PBS-Tritón 0.2% y PBS 1x
14. Fijar en PAF 4%-PBS 1x durante 15 min a temperatura ambiente
Se puede reutilizar el del día anterior. Es para fijar los inmunocomplejos y no perderlos durante la FISH.
15. Lavar en PBS 1x
16. Pasar rápidamente por agua destilada e incubar exactamente 1 min 55 seg en una solución de PBS 1x-0.1M NaOH, pH 12.8-13.0
Este paso sirve para desnaturalizar el DNA. Es importante que el pH sea próximo a 13, por eso, para evitar un efecto tamponador, limpiar el exceso de PBS con agua.
17. Pasar rápidamente por PBS 1x frío e incubar secuencialmente 3 minutos cada vez en PBS 1x, PBS 1x, SSC 2x fríos
Es importante que todas las soluciones estén frías para que no se renaturalice el DNA.
18. Desnaturalizar la sonda
Se prepara por condición, 1 μ L de sonda marcada con digoxigenina (ver marcaje de sonda), 1 μ L de Cot1 y 14 μ L de buffer de hibridación.
19. Añadir la sonda con cuidado y tapar con un cubre sin formar burbujas. Sellar el cubre al porta con cola de contacto.

20. Incubar toda la noche a 37°C en una cámara húmeda protegido de la luz.
21. Quitar el cubre con cuidado evitando que se seque la muestra.
22. Lavar secuencialmente 5 min cada vez y a temperatura ambiente en SSC 2x, SSC 2x, SSC 1x, PBS-Tritón 0.2% y PBS 1x
23. Incubar con anticuerpo anti-digoxigenina diluido en solución de bloqueo (según recomiende el fabricante) 2h a temperatura ambiente.
Si se quiere hacer doble inmunoFISH, se recomienda usar un anticuerpo anti-dig de origen de cabra
24. Lavar secuencialmente 5 min cada vez en PBS 1x, PBS-Tritón 0.2% y PBS 1x
25. Incubar con anticuerpo secundario
26. Lavar secuencialmente 5 min cada vez en PBS 1x, PBS-Tritón 0.2% y PBS 1x
27. Montar en Mowiol o ProLong antifade (#P7481, Invitrogen)

Marcaje de la sonda con DIG-Nick Translation para DNA FISH

Usar el kit de marcaje DIG-Nick translation (#11 745 816 910, Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

1. Incubar a 15°C durante 1h30min.

1 μ g de BAC purificado con Nucleobond Kit BAC 100, siguiendo las instrucciones del manual (# 740 579, Cultek)

+4 μ L de kit de marcaje

+completar con agua hasta 20 μ L

2. Detener la reacción de marcaje con 1 μ L de EDTA 0.5M, pH 8 e incubar 10min a 65°C.

3. Pasar las sondas por columnas Microspin G50 (#27 5333-01, Amersham) para eliminar los nucleótidos marcados no incorporados a la sonda.

Guardar a -20°C.

Es bueno correr la sonda para comprobar que se obtienen fragmentos de unos 100-200 bp.

Se suele usar 1 μ L de sonda por FISH.

6. Protocolo de obtención de células aisladas.

6.1. Protocolo de obtención de Islotes pancreáticos.

Este protocolo está optimizado para obtener islotes pancreáticos de ratón. Normalmente no se trabaja con más de seis animales. Anestesiarse los animales con una solución de uretano 15% (inyectar 100 μ L por cada 10g de peso).

Como preparar los reactivos de este protocolo está indicado en el apartado Reactivos Básicos de este mismo capítulo.

1. Anestesiarse al animal con una inyección intraperitoneal.
2. Abrir al animal, de manera a acceder a la zona abdominal. Lavar la zona con PBS1 x y buscar a lo largo del intestino la inserción del colédoco. Cerrar esta inserción con un *clamp*.
El colédoco es un conducto que comunica el páncreas con el intestino y que sale de debajo del hígado. Clampear esa zona para que la colagenasa que se inyecte vaya al páncreas y no al intestino.
3. Buscar la zona del colédoco más amplia que acostumbra a estar cerca del hígado. Con mucho cuidado y con ayuda de unas pinzas limpiar esa zona de grasa y tejido conectivo.
La finalidad es hacer accesible la pared del colédoco para poder hacer un pequeño corte a partir del cual accederá la cánula.
4. Realizar un corte en la pared del colédoco. Llenar la jeringa de solución de colagenasa P (1mg/mL) que todo este tiempo ha estado en hielo. Introducir la cánula en el colédoco a partir del corte y profundir el páncreas con la solución de colagenasa P.
Este es el punto más delicado, por la complejidad de la operación. La perfusión ha funcionado si se hincha el páncreas. En algunas ocasiones la perfusión no es completa, en cuyo caso se pincha con la cánula directamente en las zonas no profundidas para intentar profundirlas.
5. Extraer el páncreas canulado con unas pinzas y bajo la lupa para no romper el tejido y pasarlo a un tubo *Falcon* de 50mL que previamente estaba en hielo. Dejar el *Falcon* en el hielo y proceder con la perfusión de otro páncreas.

Hay que evitar al máximo rasgar el tejido a fin de evitar la liberación de proteasas y RNAsas.

6. Al tener todos los páncreas, cada uno de ellos en un *Falcon de 50mL*, incubar a 37°C con una agitación muy suave durante 12 minutos a fin que la colagenasa P digiera las uniones intercelulares y permita la liberación de los islotes.

Cada vez que se adquiera un lote nuevo de colagenasa P, deberían testarse los tiempos de incubación óptimos para maximizar la obtención de islotes; un exceso en el tiempo de incubación sobredigerería los islotes y un defecto reduciría la cantidad de islotes obtenidos.

7. Detener la reacción con 50mL de HBBS 1x-BSA frío. Dejar los *Falcon* en hielo durante 5 minutos a fin de que los islotes precipiten al fondo.

A no ser que se indique lo contrario los reactivos, así como los islotes deben conservarse en frío.

8. Retirar el HBBS 1x-BSA aspirando con una pipeta hasta el cono del *Falcon*. La mayoría de tejido habrá precipitado en el fondo. Para ayudar a la disgregación de los islotes, pasar 3 veces por una aguja de 14g el tejido con mucho cuidado y tratando de no hacer burbujas.

9. Lavar el tejido con 20 mL de HBBS 1x-BSA frío y dejar en hielo 1 minuto para que sedimenten los islotes. Repetir el lavado dos veces más.

10. Retirar el HBBS 1x-BSA con pipeta hasta el cono y pasar los islotes a un *Falcon* de 15 mL. Añadir HBBS 1x-BSA hasta 14mL y centrifugar a 580xg 1 minuto a 4°C.

11. Resuspender el *pellet* en 7 mL de Histopaque 1090 a temperatura ambiente.

Con este histopaque se genera un gradiente de densidad en el cual se pueden separar los islotes del resto de tejido, por eso es muy importante que esté todo muy bien resuspendido.

12. Añadir 7 mL de HBBS 1x-BSA con mucho cuidado para no mezclar las dos fases del gradiente.

13. Centrifugar a 950xg durante 20 minutos a temperatura ambiente sin freno para no romper el gradiente.
14. Recuperar la interfase donde flotan los islotes. En el fondo del tubo queda un *pellet* de tejido acinar. Pasar los islotes a un nuevo *Falcon* de 15mL y completar el volumen hasta 14mL con HBBS 1x-BSA.
15. Centrifugar a 1400xg durante 4 minutos a 4°C.
16. Retirar el sobrenadante y resuspender los islotes en 14mL de HBBS 1x-BSA. Realizar hasta 4 lavados, dejando siempre sedimentar los islotes. Aspirar el sobrenadante con pipeta.
17. Resuspender el *pellet* en 10mL de HBBS 1x-BSA y pasarlo a una placa *Petri*. Limpiar bien el fondo del *Falcon* para no perder ningún islote.
18. Utilizando un lupa binocular, escoger y contar los islotes que serán utilizados para cultivar o para extraer RNA, DNA o proteína nuclear.

6.2. Protocolo de obtención de hepatocitos

Este protocolo está optimizado para obtener hepatocitos a partir de hígado de ratón. Normalmente se obtienen unos 30-40 millones de células con el hígado de un ratón de 1-1.5 meses de vida. Como preparar los reactivos de este protocolo está indicado en el apartado Reactivos Básicos de este mismo capítulo.

1. Anestesiarse al animal con una inyección intraperitoneal.
2. Abrir al animal, de manera a acceder a la zona abdominal. Lavar la zona con PBS 1x y buscar cerca del inicio del hígado la vena cava (es la vena que une el hígado y el corazón).
3. Limpiar bien la vena de grasa y pasar un hilo de sutura por debajo de la vena. Realizar un nudo flojo y dejarlo lo más cerca del hígado.
Con este hilo se sujeta la cánula para evitar que se salga al profundir las diferentes soluciones de trabajo.
4. Realizar un corte en la parte más ancha de la vena cava, cerca del corazón. Limpiar el exceso de sangre con PBS 1x
5. Introducir la cánula en el colédoco a partir del corte y profundir el hígado con 10 mL de solución de perfusión. Cuando el hígado esté blanco, realizar un corte del lado opuesto del hígado para liberar presión.
*De esta manera se evita romper hepatocitos por exceso de presión.
Este es un buen momento para poner a precalentar la solución de colagenasa a 0.5mg/mL*
6. Seguir perfundiendo con 10mL de solución de perfusión-BSA y seguidamente 10mL de colagenasa tipo I previamente calentada a 37°C. Dejar incubar unos 2min a temperatura ambiente.
El BSA evitará un exceso de digestión por parte de la colagenasa.
7. Diseccionar el hígado canulado y disgregar mecánicamente con la ayuda de dos pinzas en un exceso de solución de HBSS-BSA.
El HBSS-BSA detendrá la reacción de digestión

8. Filtrar la solución con los hepatocitos con un filtro de 100 μm , adaptable para tubo *Falcon* de 50mL (#352360, BD Pharmigen).
9. Centrifugar a 600rpm 1min a 4°C
10. Resuspender con HBSS-BSA en un volumen adecuado.



Otras PUBLICACIONES

LINKS:

IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas

Georg Mellitzer, Stefan Bonn , Reini F Luco, Mark Van De Castele, Nathalie Lenne-Samuel, Patrick Collombat, Ahmed Mansouri, Jacqueline Lee, Michael Lan, Daniel Pipeleers, Finn C Nielsen, Jorge Ferrer, Gérard Gradwohl and Harry Heimberg
The EMBO Journal (2006) **25**, 1344–1352

<http://www.nature.com/emboj/journal/v25/n6/abs/7601011a.html;jsessionid=C7EC8DAE2894049BBB5BA25B040BEFA6>

***Hnf6* and *Tcf2* (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas**

Miguel A. Maestro, Sylvia F. Boj, Reini F. Luco, Christophe E. Pierreux, Judit Cabedo, Joan M. Servitja, Michael S. German, Guy G. Rousseau, Frédéric P. Lemaigre and Jorge Ferrer
Human Molecular Genetics, (2003) **12(24)**, 3307–3314

<http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/content/full/12/24/3307>

REINI F. LUCO

rfluco@yahoo.com

Institut d'Investigacions August Pi i Sunyer (IDIBAPS)
c/Casanova 143-Lab 411
08036 Barcelona, Spain
(+34) 932 275 400-2598

EDUCATION

- 2002-2006: PhD candidate in Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona (at Dr. Jorge Ferrer's Lab)
- 1997-2002: Graduated in Molecular Biology, University of Barcelona

TRAINING EXPERIENCE

- 2002-present: PhD candidate in the Laboratory of Dr. Jorge Ferrer at the IDIBAPS institute (Dpt. Endocrinology)
- fall 2004: Short staying in the Laboratory of Dr. Gérard Gradwohl, INSERM, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- 2001-2002: Student Collaboration with Dr. Joan Tomas of the Department of Microbiology, University of Barcelona.

RESEARCH AWARDS

- Awarded the Generalitat of Catalunya PhD fellowship (2003-2006)
- Awarded University of Barcelona student fellowship for a collaboration in a Department (2001-2002)

SKILLS

- *Molecular Biology*: Extensive experience with Chromatin Immunoprecipitation (ChIP), DNA immuno-FISH, DNase I general assay, RNA extraction from animal tissue (Embryonic and adult pancreas, liver, etc), RT-PCR and Real Time PCR.
- *Histology*: Extensive experience in preparation and analysis of frozen and paraffin embedded tissues (embryonic and adult) including in situ hybridation and immunofluorescence assays.
- *Image analysis*: Experience in Optical and Confocal microscopy. Some familiarity with Electronic microscopy (MET).
- *Mouse Handling and Dissection*: Detailed knowledge of mouse handling and techniques including dissection of adult and embryonic tissues and cell isolation for primary culture.
- *Cell Culture*: Working with numerous cell types including embryonic stem cells, beta-cells, hepatoblasts, fibroblasts and primary culture of mouse hepatocytes and islets.
- *Protein Techniques*: Familiar with nuclear extracts, Western blotting and EMSA.

PUBLICATIONS

- **Luco RF**, Maestro MS, Ferrer J, *Hnf1 α repositions its genomic targets to subnuclear histone code domains*
In revision at J Cell Biol, 2006
- **Luco RF**, Maestro MA, Pozo del N, Philbrick WM, Perez de la Ossa P, Ferrer J. 2006 *A conditional model reveals that induction of HNF1a in Hnf1a-null mutant beta-cells can activate silenced genes postnatally, while overexpression is deleterious.*
Diabetes, 2006 August issue
- Mellitzer G*, Bonne S*, **Luco RF**, van de Castele M, Lenne-Samuel N, Collombat P, Mansouri A, Lee J, Lan M, Pipeleers D, Nielsen FC, Ferrer J, Gradwohl G, Heimberg H. *IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas.*
EMBO J., 2006 Mar 22;25(6):1344-52
- Maestro MA, Boj SF, **Luco RF**, Pierreux CE, Cabedo J, Servitja JM, German M, Rousseau GG, Lemaigre FP and Ferrer J. *Hnf6 and Tcf2 (MODY 5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas.*
Hum Mol Genet., 2003 Dec 15;12(24):3307-14.
- Parrizas M, Boj SF, **Luco RF**, Maestro MA and Ferrer J.
Chromatin Immunoprecipitation (chip) using isolated islets of Langerhans.
Methods in Molecular Medicine, 2002 ed. Humana press inc. (Totowa, NJ)

ORAL PRESENTATIONS/POSTERS:

- FEBS-EMBO workshop Programming pancreatic beta-cells 2006, El Perello, Spain (Oral presentation)
- 42th European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting, 2006 Copenhagen, Denmark. (Poster)
- ESF-Wellcome Trust: Signalling to Chromatin, 2006 Hinxton, UK. (Poster)
- 40th EASD Annual Meeting, 2004 Munich, Germany. (Oral presentation)

REFERENCES

Dr. Jorge FERRER, MD, PhD

jferrer@clinic.ub.es

Endocrinology Unit, Hospital Clinic de Barcelona, Institut d'Investigacions August Pi i Sunyer

Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

Tel.: +34 932 275 400 extension 3028

Dr. Gérard Gradwohl, PhD

gerard.gradwohl@inserm.u-strasbg.fr

Inserm U682, Université Louis Pasteur

3 avenue Moliere, 67200 Strasbourg, France

Tel.: +33 3 88 27 5366

Dr. Francisco X. Real, MD, PhD

preal@imim.es

Unitat de Biologia Cel.lular i Molecular, Universitat Pompeu Fabra

Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain.

Tel.: +34 93 2211009