



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Bioquímica

Profesor Patrocinante
Dra. Gudrun Kausel
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA SECUENCIA PROMOTORA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION PIT-1 DEL PEZ *Cyprinus carpio*.

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y al Título
profesional de **Bioquímico**.

Marcelo Francisco Salazar Turra
Valdivia – Chile
2003

“Es divertido hacer burbujas, pero es sensato querer pincharlas uno mismo antes de que otro lo intente...”, parte de una carta de Oswal Avery a su hermano Roy, Mayo, 1943.

A Dios, mi Madre, mi Abuelo, a Brenda y nuestro hijo Pedro Marcelo...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios. A mi profesora patrocinante, Dra. Gudrun Kausel por permitirme el honor de ser su primer tesista Bioquímico, por su gran apoyo y por enseñarme el camino de la ciencia. A mi profesor co-patrocinante Dr. Jaime Figueroa por permitirme trabajar en su laboratorio, por sus siempre correctos consejos y su particular buen humor. A mi profesor co-patrocinante Dr. Alejandro Yañez, por su contribución en la parte experimental de mi tesis. A mi madre por su Amor, su constante preocupación, comprensión, estímulo y por su incansable lucha por un entorno más humanitario y justo. Agradezco también a mi “TATA” Marcelo por todo lo que por nosotros hizo, el sabio consejo cuando era necesario y por supuesto sus canciones. A Pedro, que sin saberlo, con su llegada iluminó mi vida. A Brenda por su amor y por ese sentido del humor que tanto adoro. A mi hermana Roxana por ser ejemplo de esfuerzo y superación. A mis amigos: Marcos y Cristian, y sus hijos, por estar conmigo en las buenas y en las malas, como son los verdaderos amigos. A mis ahijados por alegrar mis visitas. A mis compañeros de laboratorio Ximena, René, Denisse, Alex, Rodrigo, Cecilia por su apoyo y buena onda. A Marcos Maureira y Andrés Escobar por su amistad.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de Peces del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile gracias al apoyo de la **Dirección de Investigación** de la Universidad a través del proyecto **DIDUACH 2002-18**.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE GENERAL	iv
INDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	viii
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MATERIALES Y METODOS	9
3.1 MATERIALES	9
3.1.1 Reactivos	9
3.1.2 Enzimas	9
3.1.3 Material Biológico	10
3.1.4 Animales de experimentación	10
3.1.5 Oligonucleótidos	10
3.2 METODOS	12
3.2.1 Almacenamiento de clones bacterianos a -80°C	12
3.2.2 Preparación de DNA plasmidial a escala pequeña	12
3.2.3 Preparación de células aptas para ser infectadas con fagos	13
3.2.4 Cultivo de fago lambda en medio sólido	13
3.2.5 Preparación de solución de almacenamiento de fago lambda	14
3.2.6 Determinación de título de un stock fago lambda	15
3.2.7 Rastreo de la biblioteca genómica del pez <i>Cyprinus carpio</i>	15

3.2.8	Preparación de DNA viral por método CTAB	17
3.2.9	Cuantificación de ácidos nucleicos	18
3.2.10	Reacción en cadena de la polimerasa	19
3.2.11	Fraccionamiento de DNA en geles de agarosa	20
3.2.12	Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa	20
3.2.13	Ligación	21
3.2.14	Preparación de células competentes para electroporación	21
3.2.15	Transformación por electroporación	22
3.2.16	Digestión de DNA con enzimas de restricción	22
3.2.17	Preparación de DNA genómico de sangre de carpa	23
3.2.18	Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA	24
3.2.19	Cuantificación de la incorporación de radiactividad al DNA	25
3.2.20	Método de Southern Blot	25
3.2.21	Preparación de RNA total	27
3.2.22	Reacción de RT-PCR	28
3.2.23	Programas computacionales	31
4.	RESULTADOS	33
4.1	Obtención de sonda específica de secuencia regulatoria del gen-I de Pit-1 de carpa	33
4.2	Aislamiento de la secuencia promotora del gen-I de Pit-1	33
4.3	Caracterización de la región promotora del gen Pit-1	35
4.4	Comparación de secuencias regulatorias del gen Pit-1 de carpa – diferencias específicas en gen-I/gen-II	51

4.5	Análisis de expresión	53
4.6	Análisis por Southern Blot	56
5.	DISCUSION	60
6.	BIBLIOGRAFÍA	69

INDICE DE FIGURAS

Fig.1: Alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas del gen-II de Pit-1 de carpa y del 5'-cDNA.	34
Fig.2: Aislamiento de la secuencia promotora del gen-I de Pit-1 de carpa	36
Fig.3: Secuencia promotora del gen-I de Pit-1	38
Fig.4: Alineamiento de secuencias de los genes de Pit-1.	39
Fig.5: Alineamiento de secuencias promotoras del gen Pit-1 de especies de mamíferos, aves y peces.	40
Fig.6: Posibles sitios de unión en la secuencia promotora del gen-I según TESS.	43
Fig.7: Posibles sitios de unión en la secuencia promotora del gen-I según MatInspector.	45
Fig.8: Secuencia de la región promotora del gen-I de Pit-1	47
Fig.9: Secuencia de unión de Pit-1 en regiones promotoras de genes de Pit-1.	48
Fig.10: Secuencias de sitios de unión de Pit-1 en promotores de genes blanco.	50
Fig.11: Comparación de las secuencias regulatorias de las dos copias del gen Pit-1 de carpa.	52
Fig.12: Alineamiento de cDNAs derivados de los genes II y I de Pit-1 de carpa.	54
Fig.13: Expresión de ambas copias del gen de Pit-1 de carpa.	55
Fig.14: Análisis de la expresión de los genes de Pit-1 usando un sistema automatizado de imágenes digitales	57
Fig.15: Análisis por Southern Blot en DNA genómico de carpa.	59

ABREVIATURAS

amp	Ampicilina
aa	Aminoácido
cDNA	DNA complementario
Ci	Curie
cpm	Cuentas por minuto
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxirribonucleotidos trifosfatos
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetracetico
EtBr	Bromuro de etidio
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
mA	Miliamper
mRNA	RNA mensajero
nm	Nanómetros
OD	Densidad óptica
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de polimerización de DNA en cadena
POPOP	p-bis(2-(5-feniloxazolil))-benceno
PPO	2,5-difeniloxazol
RNAsa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
T°	Temperatura
TAE	Tampón tris acetato EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades
UV	Ultravioleta

1. RESUMEN

Los cambios estacionales medio ambientales modulan la expresión de Pit-1, factor de transcripción indispensable para la regulación de la expresión del gen de prolactina, hormona del crecimiento, somatolactina y de su propio gen en el teleosteo euritermal *Cyprinus carpio*. En carpas aclimatizadas a verano la expresión está significativamente aumentada respecto a peces adaptados a invierno. El gen de Pit-1 se encuentra en dos copias en el genoma duplicado de este teleosteo. Sin embargo, este organismo tetraploide se encuentra funcionalmente diploidizado. La hipótesis de trabajo sostiene que **ambas copias del gen Pit-1 son funcionales y que podrían estar reguladas diferencialmente**. La caracterización de secuencias promotoras del Pit-1 gen-I y gen-II, reveló regiones altamente conservadas y otras francamente diferentes. En las regiones conservadas se encuentran sitios de unión de factores de transcripción que podrían participar en la regulación de ambos genes. Además, se mostró claramente la expresión del gen-I y gen-II de Pit-1. Futuros análisis de las regiones promotoras permitirán revelar efectos epigenéticos que podrían estar involucrados en la regulación de la expresión de genes de Pit-1 *in vivo* en carpas durante la aclimatización.

SUMMARY

Seasonal environmental changes modulate the expression of Pit-1, a pituitary specific transcription factor indispensable for regulation of prolactin, growth hormone, somatolactin and its own gene expression in the eurythermal teleost *Cyprinus carpio*. In summer acclimatized carp Pit-1 expression is significantly increased respect to winter adapted fish. There are two copies of the Pit-1 gene in the duplicated genome of this teleost. Nevertheless, this tetraploid organism appears functionally diploidized. The working hypothesis constitutes that **both copies of the Pit-1 gene are functional and differentially regulated**. The characterization of promoter sequences of Pit-1 gen-I and gen-II revealed regions that are highly conserved and others completely different. The binding sites of transcription factors identified in the conserved regions suggests that they might participate in the regulation of both genes. In addition, it was clearly shown that Pit-1 gen-I and gen-II are expressed. Future analyses of the promoter region will allow insight in epigenetic effects that might be involved in the gene copy specific regulation of the expression of Pit-1 genes *in vivo* in carp during acclimatization.

2. INTRODUCCION

Los cambios estacionales medioambientales a los que se encuentran expuestos algunos seres vivos, requieren respuestas compensatorias que conllevan a una serie de modificaciones en el medio interno del organismo, en lo que se ha denominado aclimatización (Proser, 1986). Estas respuestas son cambios que aparecen y desaparecen en forma prácticamente simultánea con el estímulo que los provoca y este proceso puede ocurrir en el medio ambiente natural, como es el caso de la aclimatización, o si por el contrario se produce en condiciones controladas de laboratorio hablamos de aclimatación. Estos mecanismos de adaptación son imprescindibles para lograr la sobrevivencia de los seres vivos que no son capaces de modificar el medio externo y, por lo tanto, se ven obligados a adaptarse.

El pez teleosteo *Cyprinus carpio*, ectotermo euritermal, requiere de procesos de adaptación al medio ambiente ya que este presenta importantes fluctuaciones cíclicas en temperatura, salinidad del agua y fotoperiodo, entre otros. Los mecanismos que reflejan este natural ajuste cíclico se ven tanto a nivel celular como molecular e involucran la modulación de la expresión génica a nivel transcripcional y traduccional en diversos tejidos (Krauskopf et al., 1988; Vera et al., 1993; Figueroa et al., 1994; Goldspink, 1995; Kausel et al., 1998, 1999; Sarmiento et al., 2000; Vera et al., 2000; Alvarez et al., 2001; Lopez et al., 2001).

En peces, se ha visto involucrado al eje hipotálamo-hipofisiario como el encargado de organizar la respuesta adaptativa compensatoria a estímulos como los cambios medioambientales (Figueroa et al., 1994; Kausel et al., 1999). La glándula hipófisis se encuentra ubicada pendiendo del hipotálamo, en el piso del cerebro anterior. Su origen

embrionario incluye una procedencia neural desde el diencefalo en conjunción con un componente ectodermal, creciendo por sobre la cavidad oral embrionaria (estomodeo). Este último componente forma una estructura denominada bolsa de Rathke. El componente neural de la glándula adulta, llamada neurohipófisis (pars neuralis), está estrechamente asociada con el hipotálamo, el cual produce neurosecreciones que son liberadas a la hipófisis teniendo un efecto estimulante o inhibitorio sobre la liberación de algunas de sus hormonas. La neurohipófisis de peces (y también la de vertebrados) se divide comúnmente en tres partes: eminencia media (hipotálamo), tallo infundibular y lóbulo posterior (pars nervosa). El remanente del complejo, formado por el componente ectodermal, se denomina adenohipófisis, la cual consiste de secciones histológicamente distintas que son, en general, funcionalmente equivalentes a las partes de la hipófisis de mamíferos. La adenohipófisis, en la mayor parte de los peces, está diferenciada en tres regiones: pars distalis rostral, pars distalis proximal y pars intermedia (Evans, 1993). La expresión específica del gen de prolactina en células lactotropas de la porción pars distalis rostral (RPD), del gen de hormona del crecimiento en somatotropas de la proximal pars distalis (PPD), y el gen para la somatolactina específica de peces en la pars intermedia (PI) de la glándula hipofisiaria.

Desde un punto de vista fisiológico el hipotálamo tiene parte del control de la hipófisis. En mamíferos sus numerosas hormonas llegan a la adenohipófisis, a través de la circulación portal, donde actúan sobre sus células blanco para regular su función.

Estudios anteriores sobre aclimatización en *Cyprinus carpio* han demostrado variación significativa en la expresión de diversas hormonas hipofisarias tales como prolactina (Figueroa et al., 1994) y hormona del crecimiento (Figueroa et al., 2000). Lo mismo observó Kausel et al. (1998, 1999) respecto de Pit-1, factor de transcripción tejido específico de ellas, sugiriendo que dichas hormonas estarían bajo el control de este factor.

En mamíferos y en peces Pit-1 es requerido para la expresión de los genes de prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), estimulante de la tiroides β (TSH- β), (Bodner et al., 1988; Ingraham et al., 1988) y, en peces el gen de somatolactina (Ono et al., 1994). Se han descrito sitios de unión para Pit-1 en varias regiones reguladoras de genes expresados en pituitaria (Iguchi et al., 1999) que incluyen su propio gen (de la Hoya et al., 1998).

Además de regular sus genes blanco por unión a sus sitios específicos en sus promotores Pit-1 tiene función en la regulación de la diferenciación terminal de tipos celulares hipofisarios. En mamíferos, tres de los seis tipos celulares que secretan hormonas en la glándula pituitaria, emergen del linaje que expresa Pit-1 (Ingraham et al., 1988, 1990; Bodner et al., 1988; Li et al., 1990). Análisis ontogénicos mostraron la expresión inicial de Pit-1 en la región caudomedial de la glándula pituitaria en el día embrionario 14.5 en el ratón (bajo el control de una secuencia enhancer específica que aún no se encuentra bien caracterizada pero que se encontraría entre -5.1 y -10.2 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, lo que se relaciona tanto temporalmente como espacialmente con la subsiguiente activación de los genes de GH, PRL y β -TSH. La expresión de Pit-1 se mantiene durante el desarrollo y en el adulto (Andersen and Rosenfeld., 2001). Ese concuerda con los estudios de la expresión de Pit-1 durante el desarrollo de trucha arco iris (Taneko et al., 1999). La evaluación de la aparición de las células diferenciadas de la hipófisis anterior en el desarrollo de la glándula pituitaria del pez cebra, el modelo para estudiar desarrollo en vertebrados (www.zfin.org), indica un desarrollo principalmente parecido en este ciprinidae respecto al de mamíferos (Muller et al., 2002; Andersen y Rosenfeld, 1994). Carpa y pez cebra son especies filogenéticamente muy cercanas lo que

refuerza la noción de mecanismos moleculares similares en estos teleósteos (Vera et al., 2003).

Pit-1 es una proteína miembro de la familia de factores de transcripción con homeodominio POU restringido a la región anterior de la hipófisis (Andersen y Rosenfeld., 1994; Ono et al., 1994; Poncelet et al., 1997). Está compuesta de dos dominios funcionales, el dominio de transactivación N-terminal rico en residuos serina y treonina, y el dominio C-terminal donde está localizado el altamente conservado dominio POU de unión a DNA.

En mamíferos están descritas variantes de la región 5' del gen que codifica para el dominio transactivador. Así Pit-1^a, una proteína que presenta una inserción de 26 aminoácidos (inserción beta) en el dominio de transactivación de Pit-1 producto de un procesamiento alternativo del RNA mensajero (Morris et al., 1992). El uso de un alternativo sitio aceptor del “splicing” genera una proteína, Pit-1T que contiene un inserto de 14 aminoácidos en el dominio de transactivación en la misma posición del inserto beta (Haugen et al., 1993). En mamíferos el gen de Pit-1 se encuentra en una sola copia y el aumento de complejidad de posibles funciones de la proteína se puede lograr por formación de nuevas combinaciones de las regiones codificantes y la producción de proteínas parcialmente diferentes que presentan una modulación y especialización de la función de la proteína “original”. Así, mientras Pit-1 es un fuerte activador de los promotores de prolactina y hormona del crecimiento (Bodner et al., 1988; Ingraham et al., 1988), Pit-1^a es un muy débil activador del promotor de prolactina pero activa eficientemente el gen de hormona del crecimiento (Majumdar et al., 1996; Kurima et al., 1998). Por otro lado, la variante de “splicing” Pit-1T es necesaria para la eficiente activación del gen que codifica para la subunidad beta de TSH (Haugen et al., 1993).

En el caso de las aves, específicamente en pavo, la organización del gen de Pit-1 (tPit-1) es comparable al gen de mamíferos con un exón adicional entre los exones II y III que no está presente en mamíferos. Este exón codifica para una región de 38 aa y se designa exón 2a. Además en esta especie existen tres variantes de cDNA con diferentes extremos 5' los cuales son generados por uso de alternativo sitio de inicio de la transcripción y por "splicing" alternativo. El tPit-1-beta utiliza el sitio aceptor de "splicing" río arriba en el exón II lo que resulta en una proteína 28 aa más larga que tPit-1. Un sitio de inicio de la transcripción alternativo río abajo del intrón I genera el variante tPit-1W (Kurima et al., 1998).

En peces no se han observado variantes del "splicing" en el gen Pit-1 y por lo tanto parece que no juegan un rol importante para el funcionamiento de Pit-1 (Majumdar et al., 1996). La proteína presenta los mismos dominios transactivador y de unión a DNA que en mamíferos pero en la región del gen que codifica para la región transactivadora presenta secuencias adicionales que codifican para una región adicional en el exón I denominada inserto beta de 29 aminoácidos (homólogo a la secuencia de 26 residuos de Pit-1^a en mamíferos) y un nuevo exón denominado exón-gamma que codifica para 33 aa coincidente con la unión entre el exón II y el III de Pit-1 de mamíferos (Majumdar et al., 1996; Lorens et al., 1996).

El dominio de unión al DNA de Pit-1, es una región altamente conservada y le permite unirse a diversos sitios que incluyen promotores y "enhancers" de genes blanco, incluyendo su propio gen (Chen et al., 1990; Jacobson et al., 1997). Pit-1 se puede unir como dímero o como monómero a la secuencia consenso (A ó T)TATNCAT de los promotores de sus genes blanco (Yamada et al., 1993; de la Hoya et al., 1998).

Es necesario tomar en cuenta que la carpa es un organismo tetraploide, por lo tanto genes reportados como de copia única en vertebrados, en la carpa pueden existir en dos copias y cuatro alelos (Leipoldt, 1983; Ferris y Whitt, 1997). Existen dos genes para hormona del crecimiento en *C. carpio* (Chiou et al., 1990; Figueroa et al., 2000) y fueron encontrados dos cDNAs para esta proteína (Zhao et al., 1996). En el caso de Pit-1 se encontraron dos genes (cGP5 y cGP7, Kausel et al., 1999), pero no se sabe si los dos genes se expresan o sólo uno de ellos. La hipótesis de este trabajo sostiene que ambas copias se expresan y son reguladas diferencialmente. Para dilucidar los mecanismos de regulación de la expresión de uno o ambas copias, este trabajo se propuso revelar las secuencias de regiones río arriba de las regiones codificantes para evaluar la estructura funcional de los promotores y relacionarla con el efecto del medio ambiente en la expresión en la glándula pituitaria de este pez. El plan de trabajo propone:

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Primer objetivo específico: Generar sonda específica de secuencias regulatorias del factor de transcripción hipofisiario Pit-1 para ser utilizada en el rastreo de una genoteca de carpa.

Segundo objetivo específico: Obtener clones con secuencias genicas de Pit-1.

Tercer objetivo específico: Caracterizar secuencias regulatorias del factor hipofisiario Pit-1 de *Cyprinus carpio*.

Cuarto objetivo específico: Determinar posibles elementos cis-regulatorios en las secuencias del promotor del factor hipofisiario Pit-1.

Las secuencias determinadas en el desarrollo del trabajo servirán de base para futuros estudios funcionales que podrán dilucidar mecanismos de regulación epigenéticos de la expresión génica en respuesta a estímulos ambientales (Jaenisch y Bird, 2003).

MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos

En Sigma Chemical Co., fueron adquiridos los siguientes reactivos: ampicilina, azul de bromo fenol, ácido deoxicólico, Nonidet P-40, EDTA, bromuro de etidio, RNAsa y DNAsa.

En Perkin Elmer Life Sciences Inc., se adquirió [α^{32} P]-dCTP (3000 Ci/mmol), Film radiográfico, solución reveladora y fijadora Kodak.

En Merck (Darmstadt, Alemania), se adquirió glicerol, ácido tricloroacético, NaH_2PO_4 , MgCl_2 , BSA, formamida y cloroformo.

En Gibco BRL el medio de cultivo Luria Broth base, el X-gal y el IPTG.

De Winkler y Zawadsky el agar, SDS, citrato de sodio y cloruro de sodio.

De FMC bioproducts, agarosa.

De Invitrogen el sistema de marcaje "Random Primers DNA Labeling System". El POPOP se adquirió en Amersham. El papel 3MM en Whatman. El "kit GeneClean" en BIO101.

De Promega se adquirieron dNTPs, Tris.

3.1.2 Enzimas

De Gibco-BRL se usaron las enzimas de restricción *Eco* RI, *Pst*I y la enzima viral transcriptasa reversa (RT) Superscript.

De Promega las enzimas, *Bam*HI, *Hind*III, *Taq* polimerasa, T4 DNA ligasa y su correspondiente tampón T4 DNA ligasa 5X (Tris-HCl 0,2 M pH 7.6; MgCl_2 0,1 M; DTT 0,1 M).

De Invitrogen se adquirió DNAsa libre de RNAsa

De Life Technologies do Brasil Ltda. fueron adquiridas la *Taq* polimerasa recombinante con su correspondiente tampón 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8.4; KCl 500 mM) y MgCl₂ 50 mM.

3.1.3 Material Biológico

En Stratagene se adquirieron Células XL1 Blue MRAP2 y la biblioteca genómica construida en el vector de reemplazo λ FIX II, a partir de DNA de hígado de carpa.

3.1.4 Animales de experimentación

Los ejemplares del pez *Cyprinus carpio* fueron capturados en ríos colindantes a la ciudad manteniéndose vivos en una jaula de 3 x 2 x 4 m, localizada en el río “Cau-Cau”, Valdivia , o bien, capturados y seguidamente sacrificados en nuestro laboratorio. Los cadáveres se eliminaron en el incinerador del hospital veterinario de la Universidad.

3.1.5 Oligonucleótidos

Oligo T7: complementario a la secuencia de reconocimiento de la RNA polimerasa del bacteriofago T7 ubicada en el brazo largo del vector de reemplazo λ FIX II.

5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

Oligo T3: complementario a la secuencia de reconocimiento de la RNA polimerasa del bacteriofago T3 ubicada en el brazo corto del vector de reemplazo λ FIX II.

5'-TAT TCC CTC ACT AAG CTA-3'

Oligo cPit-1-5a (oli 5a, antisense): con secuencia derivada a partir de la región 5' del cDNA correspondiente al factor de transcripción Pit-1 del pez *Cyprinus carpio* (Acc. N°: AF 096863, nt.136-155).

5' –GTA GTG AAG CAA TCA GTG GT- 3'

Oligo cPit-1-6s (oli6s, sense): cuya secuencia fue generada del gen-I (GP4, Acc. N°: AY 273789, nt. 687-707).

5' –CGA TGC CTC GTG TGC AGG AC- 3'

Oligo cPit-1-7s (oli7s, sense): cuya secuencia fue generada del gen-II (GP7, Acc. N°: AF 132287, nt. 1060-1080).

5' –ACA GGT GGG ACC CTG AGT AG- 3'

Oligo cPit-1-3a: (oli3a, antisense), (nt. 6665-6684 del gen-II de Pit-1, exón III, Acc.No.AF132287, idéntico en gen-I).

5' –GCG GCG GTA AGC TGT GGG TC- 3'

3.2 METODOS

3.2.1 Almacenamiento de clones bacterianos a – 80 °C

Se tomó una colonia de células aisladas y se realizó un cultivo en 20 ml de LB con ampicilina (50 µg/ml) a 37 °C con agitación rotatoria constante (200 rpm, Environ-Shaker, Orbit, Lab-Line) por 12 a 16 horas. Dicho cultivo se centrifugó a velocidad media (4.000 rpm, Centrifuga Wifug, Estocolmo, Suecia) por 5 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 ml de solución de almacenamiento sin glicerol. Luego se repartió en 500 µl en dos tubos eppendorf de 1.5 ml y se le agregó 250 µl de glicerol 100% estéril; se mezcló y resuspendió bien antes de guardar a –80 °C.

3.2.2 Preparación de DNA plasmidial a escala pequeña

De las colonias de bacterias transformadas se sembraron cultivos líquidos en 3 ml de LB líquido con ampicilina (50 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación rotatoria constante. A partir de los cultivos se llenó tubos de 1.5 ml, se centrifugaron a temperatura ambiente por 2 minutos a velocidad máxima (14.000 rpm, en rotor 1153, centrifuga Hettich Zentrifugen) y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió suavemente en 300 µl de S1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 400 µg/ml RNAsa A) se agregó 300 µl de S2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) se mezcló por inversión, tras lo cual, se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos, se agregó 300 µl de S3 (Acetato de potasio 2.55 M, pH 4.8) y se mezcló por inversión una vez lento y con cuidado, dejándolos en hielo por 10 min. Posteriormente, se centrifugó por 5 minutos a velocidad máxima y se recuperó el sobrenadante en un set de tubos nuevos. Se agregó 450 µl de fenol

equilibrado en TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) y 450 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión varias veces y finalmente se centrifugaron por 3 minutos a velocidad máxima para luego recuperar la fase acuosa (no más de 900 μ l). En una nueva batería de tubos se agregó la fase acuosa e igual volumen de isopropanol, se mezcló e incubó a -20°C por 10 minutos. Se centrifugó por 15 minutos a velocidad máxima a 4°C , se eliminó el sobrenadante y se dejó secar al aire por 5 minutos. Finalmente el DNA plasmidial se rehidrató con 30 μ l de H_2O conteniendo 1 μ l de TE/RNAsa 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se dejó a 4°C por lo menos 10 minutos.

3.2.3 Preparación de células aptas para ser infectadas con fagos

Se eligió una colonia de un cultivo puro de células XL1 Blue MRAP2 e inoculó en 50 ml de medio LB líquido estéril, suplementado con MgSO_4 10 mM y maltosa 0.2%, se dejó con agitación rotatoria constante durante 4 horas a 37°C . Cuando la densidad óptica, medida al espectrofotómetro a 600 nm alcanzó 0.5, se detuvo la agitación y el cultivo se enfrió a 4°C .

Las bacterias se sedimentaron a velocidad media por 10 minutos a temperatura ambiente y luego fueron resuspendidas en MgSO_4 10 mM en un volumen igual al volumen original de cultivo.

3.2.4 Cultivo de fago lambda en medio sólido

El método de Sambrook et al. (1989), descrito inicialmente por Manfioletti (1988), fue adaptado para desarrollar cultivo de fago λ en placa petri. Se mezcló 100 μ l de células XL1 Blue MRAP2 con 100 μ l de cada dilución de fagos, se incubaron por 15- 20 minutos

a 37 °C para permitir que las partículas de fago se adsorban a las bacterias. Se agregó LB Top-Agar (LB con 0.8 % de agar), el cual se encontraba a 50 °C, a cada dilución, se agitó cuidadosamente y se vertió inmediatamente en el centro de una placa de petri con LB agar (LB con 1.8 % de agar) sólido previamente preparada y precalentada a 37 °C. Para placas de 9 centímetros diámetro se utilizaron 4 ml Top-Agar y para placas de 13,7 centímetros de diámetro, unos 6,5 ml Top-agar. Se inclinó ligeramente la placa para asegurar una distribución uniforme del top agar tratando de evitar la formación de burbujas. Las placas se cerraron y se mantuvieron quietas por 5 minutos a T° ambiente Se incubó a 37 °C por 12 a 16 horas en una estufa de incubación, para permitir el desarrollo de los fagos.

3.2.5 Preparación de solución de almacenamiento de fago lambda

Para la preparación de solución de almacenamiento (solución stock) de fago lambda, se preparó de una unidad formadora de placa de lisis (“plaque forming units”, pfu) positiva, producto del rastreo, y se sembró para obtener placas con la capa de células totalmente lisadas. Se agregó 10 ml de tampón SM estéril (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM y gelatina 0.01 %) y se incubó a 4 °C por 3 a 4 horas con agitación constante, con el fin de eluir el lisado de los fagos, constituido por las partículas virales liberadas de las células infectadas. Luego de esto, el eluato fue colectado en tubos Falcon con una pipeta Pasteur, se le agregó cloroformo (0.5 ml/10 ml lisado), se mezcló y se centrifugó a velocidad media por 10 minutos a 4 °C para sedimentar las células bacterianas que pudieran quedar, se recolectó el sobrenadante que constituye el lisado de fago. El lisado del fago sirvió tanto para la preparación de solución de stock, como para la propagación de más de este recombinante y para la preparación del DNA de los fagos. Para almacenar los

stocks a 4°C se agregaron unas gotas de cloroformo y para guardar a largo plazo a -80°C se preparó stock con 7% DMSO (dimetilsulfóxido).

Luego de realizar el protocolo de preparación de stocks de fago lambda hasta la etapa de centrifugación a 4 °C por 10 minutos y recolectar el sobrenadante, a una alícuota de este se le agregó una gota de cloroformo, se mezcló y se agregó DMSO a una concentración final de 7 %, se alícuotó en tubos Eppendorf de 1.5 ml para finalmente almacenar a -80 °C.

3.2.6 Determinación del título de un stock de fago lambda

Para la determinación del título de una solución stock de fago y también de la biblioteca genómica de carpa en el vector λ FixII (Stratagene), se prepararon diluciones seriadas 1×10^{-1} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} y 1×10^{-5} de la biblioteca en tampón SM. Se mezcló 100 μ l de células XL1 Blue MRAP2 con 100 μ l de cada dilución de fagos y se procedió según el protocolo de cultivo de fago λ en placa petri. Se contaron las pfu de cada una de las diluciones. Para estimar el título se obtuvo el número de pfu/ml en cada dilución utilizando una aproximación, por ejemplo, para la dilución 1×10^{-5} :

$$160 (\text{N}^\circ \text{ de pfu en placa}) \times 10^5 (\text{dilución}) \times 10 (100 \mu\text{l cultivo celular}) = 1.6 \times 10^8 \text{ pfu/ml.}$$

3.2.7 Rastreo de la biblioteca genómica del pez *Cyprinus carpio*

Para aislar clones genómicos con secuencias del 5' del gen-I de cPit-1, se rastreó la biblioteca genómica de carpa en el vector lambda FixII (Stratagene). Como sonda se utilizó el 5'cDNA.

En el rastreo, se utilizó el protocolo de cultivo de fago en placa petri de diluciones de stocks de fagos para obtener aproximadamente 5×10^4 pfu/placa. Se rastrearon aproximadamente un total de 7×10^5 pfu.

El rastreo de los recombinantes en el vector fago lambda se realizó por “plaque-lift” según Sambrook et al. (1989). Después de la incubación a 37 °C por 12 a 16 horas, las placas fueron sacadas de la estufa de cultivo y luego de verificar que contenían pfu discretas, no confluyentes y bien distribuidas en el área del soporte sólido (Top agar), fueron selladas con papel parafilm por el borde para evitar contaminación y dejadas por 1 ó 2 horas en una pieza refrigerada a 4 °C. Usando guantes y pinzas se tomó una membrana nitrocelulosa del diámetro de la placa, doblándola con cuidado se puso sobre la placa dejando que se humedezca y se adhiriera a la superficie del agar, teniendo cuidado de que quede correctamente adherida y sin moverla. La primera membrana de una placa quedó 30 segundos en contacto con el agar de la placa, la segunda membrana de esta misma placa, el duplicado, por un minuto. Mientras la membrana permaneció adheridas a la superficie del top agar se hicieron marcas de referencia sobre la membrana con una aguja con carbón activado y se marcaron estos puntos al reverso de la placa. Luego la membrana fue retirada con cuidado para que no se despegue el top agar y se dejó flotando por 5 a 10 minutos invertida en una solución denaturante (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M) evitando la formación de burbujas entre la solución y la membrana. Luego la membrana fue retirada de la solución denaturante, se dejó escurrir el exceso de líquido y fue colocada en una solución neutralizante (Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M) por otros 5 a 10 minutos. Pasado este tiempo la membrana se lavó dos veces en soluciones de lavado (2X SSC) hasta quedar bien limpia y se dejaron secar a T° ambiente sobre papel filtro aproximadamente 30 min. De una misma placa se sacaron dos filtros, es decir en duplicado.

Este procedimiento fue realizado para todas las placas de modo que al tener todas las membranas finalizando la etapa de secado, fueron colocadas en sobres de papel filtro y colocadas en horno a 80 °C por dos horas. Las membranas fueron remojadas en una solución de 2X SSC, luego sumergidas en soluciones de prehibridación (50 ml para 12 filtros) y incubados 4 horas a 42°C con agitación suave. Luego se reemplazó la solución de prehibridación por solución de hibridación que contiene el fragmento de DNA radiactivamente marcado y denaturado a una concentración 1×10^6 cpm/ml usado como sonda. Se hibridó toda la noche a 42°C con agitación suave. Los filtros se lavaron con alta estrictez hasta $0,1 \times$ SSC por 15min a 42 °C.

3.2.8 Preparación de DNA viral por método de CTAB

Este método de extracción de DNA desde las partículas de fago lambda se basa en lo descrito por Manfioletti (1988). El lisado de fagos de cada placa fue recuperado en tubos Falcon de 15 ml y tratados con DNAsa 20 µg/ml por 20 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 4.000 r.p.m. a 4 °C (HERAEUS Megacentrifuge 1.0, rotor HERAEUS N° 3041). El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se agregó un volumen igual de resina DE-52 al 80% (diaminoetil celulosa, Whatman, resuspendido en medio LB). Se mezcló por inversión durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron por 10 minutos a velocidad media a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante el cual fue limpiado de la resina pasándolo por una columna plástica con una frita porosa con lo cual se obtuvo partículas virales libres de restos de DNA bacteriano y/o resina. Al volumen obtenido (12 ml) se agregó 500 µl de EDTA 0.5 M y 32 µl de proteinasa K 20 mg/ml para una concentración final de 20 mM y 50 µg/ml respectivamente. Se incubó a 45 °C por 20 min y

posteriormente se agregó solución con el detergente catiónico CTAB (CTAB 5% + NaCl 0,5 M) a una concentración final de 0.1% y se incubó a 68 °C por 15 minutos seguido de una incubación en hielo por 15 min. El DNA de fago se une al detergente CTAB y para separarlo del resto proteico que conforma la partícula viral, se centrifugó a velocidad máxima por 10 minutos a 4 °C, en tubos Eppendorf 1.5 ml. El sedimento se resuspendió con 500 µl de NaCl 1.2 M y se agregó 2 volúmenes de etanol 100% frío. Se incubó toda la noche a -20 °C para precipitar el DNA libre de CTAB. Posteriormente se centrifugó a 4 °C a velocidad máxima, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 75% dos veces, luego de los lavados los tubos se dejaron invertidos para eliminar el agua y el alcohol por 5 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se resuspendió el DNA con 4 µl de 1.2 M NaCl y 196 µl de agua estéril.

3.2.9 Cuantificación de ácidos nucleicos

La determinación de la concentración de ácido nucleico se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1203. Una unidad de absorbancia a 260 nm es igual a 50 µg/ml para DNA de doble hebra y 40 µg/ml para DNA hebra simple y RNA y aproximadamente 20 µg/ml para oligonucleotidos de hebra simple, según Sambrook et al. (1989). Con la razón OD 260 nm a OD 280 nm se estimaba la pureza de la preparación ya que en general, preparaciones puras de DNA y RNA tienen valores de 1.8 – 2.0 respectivamente Sambrook et al. (1989) y si hay contaminación con proteínas o fenol estos valores son significativamente menores.

3.2.10 Reacción en cadena de la polimerasa

El DNA de fago se sometió a una reacción de PCR con el Minicycler MJResearchTM de la siguiente manera: En tubo Eppendorf de 0.6 ml se mezcló: 39,2 μ l de agua desionizada, 1 μ l de templado (DNA del fago lambda, aproximadamente 100-300 ng), 1 μ l de cada partidor (50 pg/ μ l), 5 μ l del tampón (10X) de la enzima TaqPol, 1 μ l del mix de nucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP (10 mM c/u), 1.5 μ l de MgCl₂ 25 mM y 20 μ l de vaselina para evitar la evaporación. La reacción enzimática se programó con una “partida en caliente” para evitar amplificación inespecífica, la “partida en caliente” consiste en que antes de agregar la TaqPol se realiza un calentamiento en el termociclador: 94 °C por 3 minutos para denaturar el templado y partidores y luego la temperatura se mantiene a 80 °C, temperatura a la cual se agregó 0.3 μ l de la enzima TaqPol (1 U/ μ l). Luego, esta mezcla se sometió a 30 ciclos de polimerización programados en el termociclador de la siguiente manera:

- Paso 1. 93 °C 30 segundos, denaturación.
2. 55 °C 30 segundos, apareamiento (de acuerdo a la T_m de los partidores).
3. 72 °C 1 minuto, extensión del partidor.
4. volver al paso 1, 29 veces.
5. 72 °C 7 minutos, extensión de fragmentos incompletos.
6. 4 °C ∞ .
7. End.

De esta manera se obtuvo un producto de amplificación de 800 pb aproximadamente.

3.2.11 Fraccionamiento de DNA en geles de agarosa

El DNA se fraccionó en geles de agarosa, de acuerdo a lo descrito por Sambrook et al. (1989). La agarosa se pesó y luego se mezcló en tampón TAE 1X. Esta mezcla se fundió en microondas, se dejó enfriar a 50 °C y se vació en un molde plástico con su respectiva peineta para los pocillos, para darle forma al gel y se esperó hasta que gelifique. El gel se colocó en una cámara de electroforesis con el mismo tampón. La corrida electroforética se realizó a 75 mA constante. El volumen y el porcentaje de agarosa del gel, varió dependiendo de los tamaños de los fragmentos de DNA a separar. Al finalizar la separación se procedió a teñir el gel con bromuro de etidio 0.5 µg/ml en TAE 1X, para que se intercale al DNA y poder visualizar los fragmentos de DNA al exponer el gel a luz U.V en el transiluminador. El tamaño de los productos de amplificación se estimó por medio de marcadores de tamaño molecular, los cuales se cargaron al gel junto con las muestras y controles.

3.2.12 Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa

El DNA fraccionado en gel de agarosa, teñido con EtBr se visualizó en el transiluminador, se cortó la banda con el fragmento deseado y se pesó en tubos Eppendorf. Por miligramo pesado se agregó 3 volúmenes de NaI 6 M y se incubó a 55 °C por 10 minutos para disolver la agarosa. Se agregó 5 µl de *glass milk* bien resuspendido, se mezcló suave y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó por 5 segundos a velocidad máxima, se eliminó el sobrenadante y se realizó una centrifugación breve (*spin-down*) para poder extraer todo el sobrenadante. Seguidamente se resuspendió el sedimento con 500 µl de solución de lavado (solución de NaCl, etanol y

agua). Se repitieron los últimos pasos para extraer el sobrenadante y se secó el sedimento al aire por 5 minutos. Se agregó 12 μ l de agua estéril y se incubó a 55 °C por 10 minutos. Se centrifugó por 30 segundos a velocidad máxima y se recuperó todo el sobrenadante el cual se agregó a un nuevo tubo Eppendorf y se centrifugó por 1 minuto a 14.000 r.p.m. Se recuperó 10 μ l del sobrenadante los cuales se utilizaron para realizar la posterior ligación.

3.2.13 Ligación

El fragmento de DNA purificado se ligó al vector pGEM-T-Easy, mediante la siguiente reacción:

- 2 μ l de producto de amplificación.
- 5 μ l de tampón de ligación rápida 2X, Promega.
- 0,8 μ l de vector pGEM-T-Easy (50 ng/ μ l de DNA).
- 1 μ l de enzima ligasa T4, Promega 3U/ μ l.

Se incubó por 2,5 horas a 14 °C y luego se puso en hielo.

3.2.14 Preparación de células competentes para electroporación

A partir de una colonia aislada de la cepa XL1 Blue, se realizó un cultivo líquido en medio LB, a 37 °C, con agitación rotatoria constante, de 500 ml de medio, hasta que la densidad óptica medida a 600 nm alcanzó 0,5-0,7 , luego se centrifugó a velocidad media por 15 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 1 volumen del cultivo original (500 ml) de glicerol 10% frío, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriormente mencionadas, ahora el sedimento se resuspendió con 1/2 del volumen original de glicerol 10% frío. Se repitió la misma centrifugación, y el

sedimento fue resuspendido en 1/4 del volumen original de glicerol 10% frío y finalmente se centrifugó a velocidad máxima a 4 °C por 15 minutos y el sedimento celular se resuspendió con 2 ml de glicerol 10% frío. Esta suspensión de células se alicuotó en volúmenes de 80 µl y se guardó a -80 °C.

3.2.15 Transformación por electroporación

Se tomó una alicuota de células competentes para electroporación, que se descongelaron en hielo. La alicuota de 80 µl se mezcló con el producto de la reacción de ligación realizada, y se incubó por 1 minuto en hielo. La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación previamente enfriada en hielo. Se programó el aparato *E.coli Pulser* (Bio Rad) a 1.80 kV debido a que la cubeta utilizada fue de 0,1 cm de diámetro. Se colocó la cubeta en la cámara deslizadora, la que también se encontraba fría y se realizó la electroporación. Inmediatamente se agregó 1 ml de medio SOC, se transfirió toda la suspensión de células a un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se sembró todo en placas LB agar con ampicilina (50 µg/µl), impregnadas con 40 µl de X-Gal 5 % y 4 µl de IPTG 200 mg/ml y se incubó toda la noche a 37 °C.

3.2.16 Digestión de DNA con enzima de restricción

La digestión de DNA plasmidial en general, se realizó en un volumen final de 20 µl. Se digirieron aproximadamente hasta 3 µg en un tubo de 1.5 ml con 2 µl tampón 10X de la enzima *Eco RI* (reactivo 3 Gibco BRL, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 100 mM y MgCl₂

10 mM), 1 μ l de *Eco* RI (10 U/ μ l, BRL) y 12 μ l de H₂O destilada autoclavada. Luego se incubó a 37 °C por 2 horas.

Para el DNA genómico se digirieron aproximadamente 10 μ g de DNA en un volúmen de 50 μ l con un exceso de enzima (10 U/ μ g) y se incubó a 37 °C por aprox. 6 horas, para asegurar digestión completa.

Los productos de digestión se fraccionaron en un gel de agarosa al 1.5% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio, al exponer a luz U.V. en un transiluminador.

3.2.17 Preparación de DNA genómico de sangre de carpa

La preparación de DNA genómico se realizó según el protocolo adaptado de Garbutt et al., (1985). Se recolectó sangre total de carpa con una jeringa heparinizada directamente desde el corazón de una carpa, se transfirió a un tubo Falcon e inmediatamente se puso en hielo. Se mezcló con un volumen de buffer de lisis (NaH₂PO₄ 1 mM, deoxicolato de sodio 4 %, Nonidet P40 0,8 %, MgCL₂ 1 mM) para romper las células y se centrifugó a 10000 rpm, en rotor SS34, en centrifuga Sorvall a 4°C por 15 minutos para precipitar los núcleos, luego se eliminó el sobrenadante, al sedimento se le agregó 10 ml de buffer Tris-EDTA (Tris pH 8,3 10mM, EDTA pH8,0 5mM, NaCl 150 mM.) y se le adicionó 3,5 ml ácido perclórico 5M, se mezcló suavemente y se agregó un volumen de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 para desproteínizar, se agitó suavemente 15 minutos a temperatura ambiente para luego centrifugar a 5000 rpm, en rotor SS34, en centrifuga Sorvall, diez minutos a temperatura ambiente. Se traspasó la fase superior acuosa a un tubo limpio y estéril y se repitió la extracción 3 a 5 veces hasta obtener

una interfase clara. Una vez alcanzado este objetivo, se agregó 2,5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA, se mezcló por inversión y se dejó reposar a -20°C por 6-8 horas, luego de lo cual se colectó el DNA con una pipeta Pasteur enrollando en forma circular hasta colectarlo todo, se lavó en etanol 80% frío unas tres veces y se dejó secar al aire al lado de un mechero Bunsen, luego de 30 minutos, el DNA se redisolvió en un volumen apropiado de Tris HCl pH 7,5. Para remover proteínas residuales, esta solución se trató con proteinasa K a una concentración final de 1 mg/ml a 37°C por tres horas, se repitió la extracción con cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se siguió con el protocolo para finalmente resuspender el DNA en un volumen adecuado de tampón TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0).

3.2.18 Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA usados como sonda se marcaron con la técnica llamada *random primers* según instrucción del proveedor (Invitrogen). En general consiste en marcar fragmentos de DNA en una reacción de polimerización usando partidores hexameros al azar y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, el cual no tiene actividad 5^{\prime} - 3^{\prime} exonucleasa y es la enzima encargada de catalizar la reacción y uno de los nucleótidos marcado con ^{32}P (dATP, dGTP, dTTP, α - ^{32}P -dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml).

Se tomó 23 μl (50 ng) de templado, el que debe ser denaturado previamente incubando por 10 min a 94°C y se dejó en hielo. La siguiente mezcla se realizó en hielo: 23 μl de templado, 2 μl de dATP 10 mM, 2 μl de dTTP 10 mM, 2 μl de dGTP 10 mM, 15 μl de *random primers*, 5 μl de $[\alpha\text{P}^{32}]$ -dCTP. Finalmente se agregó 1 μl de Klenow y se incubó a 25°C por 2 horas.

3.2.19 Cuantificación de la incorporación de radiactividad al DNA

Se tomó 1 μ l de la solución radiactiva y se mezcló con 3,5 ml de TCA 10% mas 1 μ l de DNA de timo de ternera (1 mg/ml). Se incubó en hielo por 10 min y posteriormente se filtró en un kitasato, que tiene un filtro (0,2 μ m, Whatman) en el cual se adhiere el DNA. Este filtro se secó e incubó en 3,5 ml de mezcla de centelleo (4 g/l PPO y 0,1 g/l POPOP en tolueno) para medir en el contador de centelleo Packard Tricarb 1600TR las cpm de radiactividad incorporada. En general se logró una actividad específica de aproximadamente 1×10^7 cpm/ μ g.

3.2.20 Método de Southern Blot

DNA genómico se digirió con enzimas de restricción y luego se fraccionaron los productos de digestión mediante electroforesis en gel de agarosa. Del gel teñido con EtBr se tomó una foto con una regla al lado, de modo que permitiera estimar los tamaños de los fragmentos detectados por hibridación. El gel se incubó en 0,25 M HCl 10 minutos para depurinar, en solución denaturante por 30 minutos, seguido de una incubación con solución neutralizante por otros 30 minutos todo esto con agitación constante y a T° ambiente. Luego se montó la transferencia para lo cual se colocó el gel invertido sobre un papel filtro remojado en solución de transferencia (10X SSC), colgando sobre un soporte de un tamaño aproximado al del gel, en una bandeja con tampón 10X SSC. Se marcó uno de los extremos del gel para conocer el orden de los pocillos luego de la transferencia. A continuación se colocó la membrana de nitrocelulosa del mismo tamaño que el gel, en la cual se marcó el mismo extremo del gel. Luego se agregó sobre la membrana, dos papeles filtros del tamaño del gel previamente embebidos en 20X SSC, y finalmente sobre todo esto

se colocó una torre de papel absorbente la cual tiene las mismas dimensiones del gel con un peso sobre dicha torre. Esto se incubó toda la noche con el fin que transfiera por capilaridad la mayor cantidad de DNA posible a la membrana.

Luego de desmontar la transferencia, se marcaron los pocillos, se recuperó la membrana y se retiró el exceso de sal lavándola en buffer SSC 2X por 10 minutos con agitación constante. Posteriormente se procedió a fijar el DNA en la membrana, para esto la membrana de nitrocelulosa se dejó secar a T° ambiente al menos 30 minutos, se envolvió en papel filtro y se calentó a 80 °C por 2 horas en vacío.

La membrana de nitrocelulosa, conteniendo el DNA blanco, se sumergió por dos minutos en 100 ml de una solución 6X SSC, luego de lo cual se deslizó dentro de una bolsa de polietileno y se le agregó 3 ml de solución de prehibridación, previamente hervida por 10 minutos y rápidamente enfriada en hielo, la cual contiene 6X SSC, 0,5 % SDS, 5X reactivo de Denhardt (5 g de Ficoll, 5 g de polivinilpirrolidona, 5 g de albúmina sérica bovina (fracción V)), formamida 50% y DNA de timo de ternera a una concentración final de 100 µg/ml, se quitó las burbujas de aire que se formaron en la solución ya que estas pueden interferir con la reacción. Se selló el extremo abierto de la bolsa y se incubó por dos horas a 42 °C con agitación constante en un horno de hibridación.

Se reemplazó la solución de prehibridación de la bolsa por solución de hibridación. La solución de hibridación se preparó mezclando un volumen apropiado de sonda marcada con un volumen de solución de prehibridación de manera de obtener, en general, aproximadamente 1×10^6 cpm/ml. Se denaturó por calentamiento a 100°C por 10 minutos a baño maría y fue rápidamente enfriada en hielo. Se agregó la solución de hibridación a la bolsa y se incubó toda la noche a 42°C en horno de hibridación.

Luego de la hibridación se recuperó la solución de hibridación y la membrana se sometió a los siguientes lavados con agitación rotatoria para eliminar el exceso de sonda radiactiva e hibridación inespecífica:

- | | | |
|-----------------------|--------------------|---------|
| a) 2X SSC 0,1 % SDS | 5 minutos a 42 °C | 1 vez |
| b) 2X SSC 0,1 % SDS | 15 minutos a 42 °C | 2 veces |
| c) 1X SSC 0,1 % SDS | 15 minutos a 42 °C | 2 veces |
| c) 0,5X SSC 0,1 % SDS | 15 minutos a 42 °C | 2 veces |
| d) 0,2X SSC 0,1 % SDS | 15 minutos a 37 °C | 2 veces |

Luego de realizar los lavados, se envolvió la membrana en Europlas y se dejó en un cassette de exposición con una placa de rayos X (X-Omat, Kodak) sobre la membrana. Posteriormente se dejó a -80°C por el tiempo que sea necesario (entre 12 horas y una semana) dependiendo de la radiactividad incorporada a la sonda.

Una vez expuesto el film, se reveló la placa autorradiográfica en un cuarto oscuro, incubando 90 segundos en solución de revelado D 72 (Kodak) a temperatura ambiente, 1 minuto en agua y 5 minutos en solución fijadora U 3 (Kodak).

3.2.21 Preparación de RNA total

Se homogeneizaron muestras de hipófisis (50-100 miligramos) de carpa macho capturada en verano en 1 ml de Trizol utilizando un homogenizador Potter. Se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Se adicionaron 200 μl de cloroformo por ml de Trizol, se agitó vigorosamente por 15 seg y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C . Luego se recuperó la fase acuosa superior

(transparente) y se transfirió a un nuevo tubo estéril, se agregó 500 μ l de isopropanol frío y se incubó a -20°C toda la noche. Luego, se centrifugó a 14.000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C , se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó una vez con 1 ml de etanol 75% frío. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar por 5 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió el sedimento con 30 μ l de agua libre de RNAsa ó agua tratada con DEPC y se guardó a -20°C .

3.2.21 Reacción de RT-PCR

El RNA total se trató con DNAsa libre de RNAsa para liberarlo de fragmentos residuales de DNA que pudieran interferir con reacciones posteriores, para esto se preparó la siguiente mezcla para un volumen total de 20 μ l:

- 10 μ l de RNA total hipófisis de carpa (aproximadamente 30 μ g)
- 0,5 μ l de DNAsa libre de RNAsa (Invitrogen)
- 2 μ l de tampón 10 X de la enzima
- 7,5 μ l H_2O destilada libre de RNAsa.

Esta mezcla se incubó por una hora a T° ambiente, luego se le agregó 1 μ l de EDTA 25 mM y se calentó a 70°C por 10 minutos y se dejó rápidamente en hielo.

A partir de la muestra de RNA total de hipófisis de carpa libre de DNA contaminante, se realizó la reacción de la primera hebra que es catalizada por la enzima viral transcriptasa reversa (RT) Superscript (GibcoBRL), que sintetiza DNA utilizando como molde RNA en presencia de desoxirribonucleotidos. Esta enzima se incubó con oligo dT, el cual se agregó a la mezcla para que se una a los RNAs que contienen una cola de poli A en su extremo 3' (RNAs mensajeros). Entonces, la enzima sintetiza una copia de DNA

de todos los RNAs que se unen al oligo dT y se forman híbridos de RNA/DNA. Finalmente, solo la hebra de DNA actúa como templado para la posterior síntesis por PCR con partidores específicos de su DNA complementario, llevando a la síntesis de un DNA doble hebra que corresponde al cDNA. Para la reacción de la primera hebra se preparó la siguiente mezcla para un volumen total de 20 μ l:

- 5 μ l RNA total de hipófisis de carpa macho de verano tratado con DNAsa (aproximadamente 5 μ g)
- 0.5 μ l oligo dT (500 μ g/ml)
- 7 μ l agua.

Esta mezcla calentó a 70°C 10 minutos, se puso en hielo, y se agregó:

- 4 μ l de tampón 5X
- 2 μ l 0.1M DTT
- 1 μ l dNTPs (10 mM c/u)

Esta mezcla se calentó a 42°C por 2 minutos, se agregó 0,5 μ l RT Superscript (200 U/ μ l) y se incubó a 42°C por 50 minutos. Para finalizar, se calentó a 70°C por 15 minutos.

Así entonces se obtuvo la primera hebra del cDNA, el cual se utilizó para una reacción de PCR usando partidores específicos para cada copia del gen. En un tubo Eppendorf de 0,6 ml se realizó la siguiente mezcla:

- 2 μ l de cDNA de carpa macho capturada en verano.
- 1 μ l de cada uno de los partidores (gen-I: cPit-1-6s y cPit-1-3a; gen-II: cPit-1-7s y cPit-1-3a).
- 3 μ l MgCl₂ 25mM, 1 μ l 10mM de cada uno de los dNTP's.
- 5 μ l del tampón de la enzima Taq DNA polimerasa 10X.

- H₂O hasta 50 µl.

Esta mezcla se sometió a una “partida en caliente” en un termociclador, luego de lo cual se agregó 0.3 µl de la enzima TaqPol (1 U/µl). Finalmente esta mezcla se realizó el siguiente tratamiento en un termociclador:

- Paso 1. 93 °C 30 segundos Denaturación.
2. 55 °C 30 segundos Apareamiento
3. 72 °C 1 minutos Extensión del partidor.
4. volver al paso 1, 29 veces.
5. 72 °C 7 minutos Extensión de fragmentos incompletos.
6. 4 °C ∞.
7. End.

De esta manera se obtuvo un producto de amplificación de 530 pb aproximadamente. El producto de amplificación obtenido se sometió a digestión con enzima de restricción *Pst*I en un volumen final de 30 µl:

- 20 µl de producto de PCR
- 3 µl de tampón React 2 (10 X, Gibco BRL)
- 1 µl de enzima *Pst*I (10 U/µl, Gibco BRL)
- 6 µl de H₂O libre de DNAsa y RNAsa

Esta mezcla fue incubada por dos horas a 37°C tras lo cual se cargó la mitad del volumen de digestión (15 µl) en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron las bandas correspondientes a los fragmentos de restricción.

3.2.23 Programas computacionales

Para la cuantificación de la intensidad de las bandas del gel de RT-PCR, se utilizó el programa UN-SCAN-IT, (Silk Scientific, Inc.) que es un sistema automatizado de análisis de imágenes digitales.

Para el alineamiento, búsqueda de sitios de restricción y de posible unión de factores de restricción a las secuencias se utilizaron programas computacionales especiales disponibles gratuitamente en internet, los cuales basándose en el uso de matrices e información probabilística entregan valores posibles útiles para estos fines:

Banco de datos nucleotídicos:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>

Para la comparación de secuencias nucleotídicas con el banco de datos de secuencias se utilizó la herramienta BLASTn: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Otra herramienta utilizada fue BCM Search Launcher <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>. Este es un sitio de The Baylor College of Medicine que al igual que NCBI entrega herramientas para búsqueda en biología molecular y servicios de análisis en formato similar. En este sitio se realizaron alineamientos de múltiples secuencias CLUSTALW1.8,

El análisis búsqueda de sitios de restricción en secuencias fue realizado a través del programa Web Cutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>). Este programa, desarrollado por M. Heiman, permite realizar análisis de restricción en secuencias del usuario otorgándole gran cantidad de alternativas, es también accesible desde NCBI.

Se utilizaron programas para el análisis de promotores en búsqueda de putativos sitios de unión de factores de transcripción:

- **TESS (Transcription Element Search System):** <http://www.cbil.upenn.edu/tess/> , este programa es una herramienta para predecir sitios de unión de factores de transcripción en secuencias de DNA. Puede identificar sitios de unión usando secuencias consenso y matrices posicionales desde las bases de datos TRANSFAC,IMD, y de su propia base de datos CBIL-GibbsMat, permite también almacenar por cierto tiempo la información a través de la asignación de una clave de trabajo con la cual se puede acceder nuevamente a los resultados.

- **MatInspector*profesional*:**http://www.genomatix.de/software_services/software/MatInspector/matinspector.html, este programa utiliza a una biblioteca de matrices para la búsqueda de sitios de unión de factores de transcripción en secuencias de largo ilimitado. Además este programa agrupa los factores similares y/o relacionados funcionalmente en familias de matrices, optimizando la entrega de resultados.

Se utilizaron secuencias extraídas de los contigs no-ensamblados accesibles en el banco de datos de secuencias no procesadas de pez cebra:
http://trace.ensembl.org/perl/ssahaview?server=danio_rerio

4. RESULTADOS

4.1 Obtención de la sonda específica de la secuencia regulatoria del gen-I de Pit-1 de carpa.

La secuencia parcial del gen Pit-1 de carpa, previamente descrita (pGP5₁₇₀₀, secuencia parcial gen-I, Acc. N° U 92542), que abarca cuatro exones que codifican para el dominio POU de unión al DNA del gen, carece de la región codificante para el extremo N-terminal de la proteína y de la región promotora (Kausel et al., 1998). Sin embargo, el alineamiento de la secuencia del 5'-cDNA de Pit-1 de carpa (Acc. N° AF 096863) con la secuencia del cDNA derivado del gen-II (gen completo, Acc. N° AF 132287) presenta 6% de diferencias en la cadena aminoacídica derivada y 15% de diferencias a nivel nucleotídico sugiriendo que este 5'cDNA no corresponde al transcrito del gen-II pero podría corresponder al gen-I de cPit-1 (Fig. 1). Por lo tanto con el objetivo de aislar secuencias regulatorias del gen-I de Pit-1 se rastreó la biblioteca genómica de carpa construida en el vector de reemplazo λ Fix II, utilizando el 5'cDNA como sonda.

4.2 Aislamiento de la secuencia promotora del gen-I Pit-1

De un total de 0.7×10^6 recombinantes rastreadas de la biblioteca genómica de carpa construida en el vector λ Fix II, se obtuvieron 5 clones recombinantes que dieron señal positiva con la sonda específica del gen-I, el 5'cDNA. Dos de estos mostraron una fuerte señal y tres señales débiles. Los dos clones λ GP4 y λ GP8 que dieron señal intensa, se purificaron y analizaron.

Con el objetivo de determinar la orientación del inserto en el vector viral, se diseñó el partidador antisense oligo cPit-1-5a, correspondiente al primer exón del gen de Pit-1 (oli 5a, nt 136-155 del AF 096863). El PCR se realizó con cPit-1-5a y con un partidador específico para la secuencia flanqueante en el vector λ Fix II, sitio de unión de la RNA-polimerasa del fago T7 en el brazo largo y del T3 en el brazo corto (Fig. 2, A). Solamente la amplificación con los oligonucleótidos oli 5a y T7 resultó en producto de aproximadamente 780 pb en λ GP4 y λ GP8 que se esperaba contuviera la región promotora del gen-I de Pit-1 (Fig 2, B). Por lo tanto, en el clon recombinante λ GP4 se encuentra la secuencia génica completa del gen-I de Pit-1. Como ambos clones entregaron un fragmento de amplificación de igual tamaño con los partidadores utilizados, se asumió que eran equivalentes y solo se caracterizó uno de ellos, el clon λ GP4 (del clon λ GP8 se preparó un stock y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para futuros análisis en el laboratorio). El producto de amplificación, luego de ser purificado desde el gel, fue clonado en el vector pGEM-T-Easy generando pGP4₇₇₆ el que se secuenció.

4.3 Caracterización de la región promotora del gen Pit-1

La secuencia del pcGP4₇₇₆ (Acc.No AY 273789, en adelante: gen-I) se compone de 736 nucleótidos de la región 5' promotora y 40 nucleótidos de la región codificante del primer exón del gen cPit-1. Como se mencionó anteriormente, el 5'cDNA no corresponde con la secuencia del cDNA derivado del gen-II. La secuencia del pGP4₇₇₆ coincide 100% con la del 5'-cDNA, así constituyen secuencias del gen-I de Pit-1. Así entonces, de la secuencia del gen-I se conocen los 736 nt de región promotora, 40 nt de la región codificante del primer exón contenidos en el clon pGP4₇₇₆ y la secuencia que comprende

los exones III al VI contenida en el clon pcGP5 (Fig. 3). Sin embargo, en el clon λ GP4 se encuentra la región completa de la secuencia génica del gen-I de Pit-1.

Al alinear la secuencia promotora del gen-I con la región promotora del gen-II (nt. 1-1150 del AF 132287) se observó 49 % de diferencia, es decir 380 nucleótidos diferentes entre pGP4₇₇₆ y gen-II en un total de 776pb (Fig. 4). En el promotor se destacan tres bloques de homología entre el gen-I y el gen-II. Bloque 1: gen-I: nt 11-67 con gen-II: nt 12-71, 91.7% identidad (55 nt idéntico /60 nt total); bloque 2: gen-I: nt 303-334, gen-II nt 634-665, 96.8% identidad (30 nt idéntico /31 nt total); bloque 3: gen-I: nt 424-776, gen-II nt 806-1150, 88.1% identidad (311 nt idéntico /353 nt total). Estas regiones están interrumpidas por regiones que no aparean: gen-I: nt 68-302 (bp), 335-423; gen-II: nt 72-634, 666-805 (pb). En la figura 4 se muestran también los probables sitios de unión para factores de transcripción localizados en ambas secuencias obtenidos por medio del uso de programas computacionales (TESS, MatInspector). La secuencia del exon 1 del gen-I (100% idéntica a la del gen-II) y el promotor proximal está conservada respecto al gen-II, pero se observa una región de 33 nt (posición +13 a +45 en el gen-I) francamente diferente entre gen-I y gen-II (Fig. 4).

Se realizó un alineamiento de regiones promotoras proximales de genes Pit-1 (Fig.5). Se alinearon secuencias 330 nt río arriba del ATG, de distintas especies de mamíferos, aves y peces para ver si existen diferencias inter ó intra especie en la disposición de posibles sitios de unión de Pit-1 y en la arquitectura de sus promotores. La secuencia promotora del gen Pit-1 de pez cebra se aisló de los contigs no-ensamblados accesibles en el banco de datos de secuencias no procesadas de pez cebra (http://trace.ensembl.org/perl/ssahaview?server=danio_rerio). En el análisis se diferencian las secuencias de mamíferos (humano, ratón y rata) de las de peces (gen-I /gen-II de carpa y

pez cebra) y se puede observar que la secuencia de pavo es más parecida a las secuencias de mamíferos conservando incluso posibles sitios de unión de Pit-1 en común (Fig. 5, resaltados en negrita y subrayados). Al contar la cantidad de nucleótidos presentes entre la caja TATA y el ATG en los distintos promotores del gen Pit-1 se pudo observar que todos presentan alrededor de 50 nucleótidos (en pavo, a pesar que no presenta una caja TATA canónica esta distancia fue similar a mamíferos), excepto en carpa cuya distancia entre la caja TATA y el ATG, en el gen-I es de 75 nt y el gen-II de 85 nt (Fig. 5). Esta diferencia podría involucrar mecanismos de regulación distintos.

```

II  TTAACATGGATGAGGTGGTCTGAGGGGGCTCAGTATAAATACCTGCACACGCCCTGCTCATAGCACACAGGTGGGACCCTGAGTAGGACC 90
5'  -----ACACAGGTGTGCCGATGCCCTCGTGTGCAGGACTCAG 36

                                     M T C Q A F S T T D C F T T L S G D S A A L 22
II  CTGAGTAGGTGAAGATCTAGAGTCAATGACCTGCCAGGCCTTCAGCACCCTGATGCTTCACTACTCTGAGCGGAGACTCGGCTGCTCTG 180
5'  AGCCTGAGGTGAAGATCTAGAGTCAATGACCTGCCAGGCCTTCAGCACCCTGATGCTTCACTACTCTGAGCGGAGACTCGGCTGCTCTG 126
                                     M T C Q A F S T T D C F T T L S G D S A A L 22

P L L M H H T G A A D C L P V S S H T T N M M P S V P S G L 52
II  CCGCTGCTCATGCATCACACCGGAGCCGAGACTGTCTGCCCGTCTCCAGCCACACCACCAACATGATGCCTTCAGTCCCCTCAGGTCTG 270
5'  CCGCTGCTCATGCATCACACCGGAGCTGCAGACTGTCTGCCCGTCAACAGCCACGCCACCAACATGTTGCCTCCAGTCCCCTCAGATCTC 216
P L L M H H T G A A D C L P V S S H T N M P V P S L 52

P L V Q S S K R S H M H L S T S A L G N A S A S L H Y P M P 82
II  CCACTGGTTTCACTCATCCAACGCTCACATATGCACCTGTCCACTTCTGCTTTGGGCAATGCGTCAGCCAGCCTGCACTATCCAATGCC 360
5'  CCTCTGGTCCAGTCCGTTCCAACGCTCCATATGCACCTGTCCGCTTCTGCTTTGGGCAATGCGTCAGCCAGCCTGCACTACCAATGCC 306
P L V Q S S K R S H M H L S A S A L G N A S A S L H Y P P 82

P C H Y S N Q Q T T Y G M M A A Q E M L S A S I S Q T R I L 112
II  CCGTGTCACTATAGCAACCAGCAGACCACCTACGGCATGATGGCAGCACAGGAAATGCTCTCTGCCAGCATCTCCAGACCCGCATCCTG 450
5'  CCAATGTCACTATAGCAACCAGCAGACCACCTACGGCATGATGGCAGCACAGGAAATGCTCTCTGCCAGCATCTCTCAGACCCGCATCCTG 396
P C H Y S N Q Q T T Y G M M A A Q E M L S A S I S Q T R I L 112

Q T C S M P H A N M V N G A N S L Q G A L A S R L Y K F P E 142
II  CAGACCTGCAGCATGCCTCATGCCAACATGGTCAACGGAGCCAACTCACTGCAAGGAGCTCTGGCTTCACGCCTCTATAAGTTCCAGAG 540
5'  CAGACCTGCAGCATGCCTCATGCCAACATGGTCAACAGTCCAACTCACTGCAAGGAGCTCTGGCTCCACGCCTCTATAAGTTCCAGAG 486
Q T C S M P H A N M V N A N S L Q G A L A R L Y K F P E 142

H S L G G G S C 150
II  CACAGTTTGGGTGGGGCTCCTGTGCTTTGA 571
5'  CACAGTCTGGGTGGGGCTCCTGTGC----- 512
H S L G G G S C 150

```

15 % nucleótidos diferentes (73/ 490)

6 % aminoácidos diferentes (9/150)

Fig 1: Alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas del gen-II de Pit de carpa (Acc. N° AF 132287) y el 5'cDNA (Acc. N° AF 096863). Los nucleótidos diferentes se resaltan en amarillo: 15 % nucleótidos diferentes (73/ 490) y los aminoácidos deducidos distintos en rojo: 6 % aminoácidos diferentes (9/150). La secuencia del gen-II mostrada corresponde al mensajero parcial derivado de la secuencia nucleotídica.

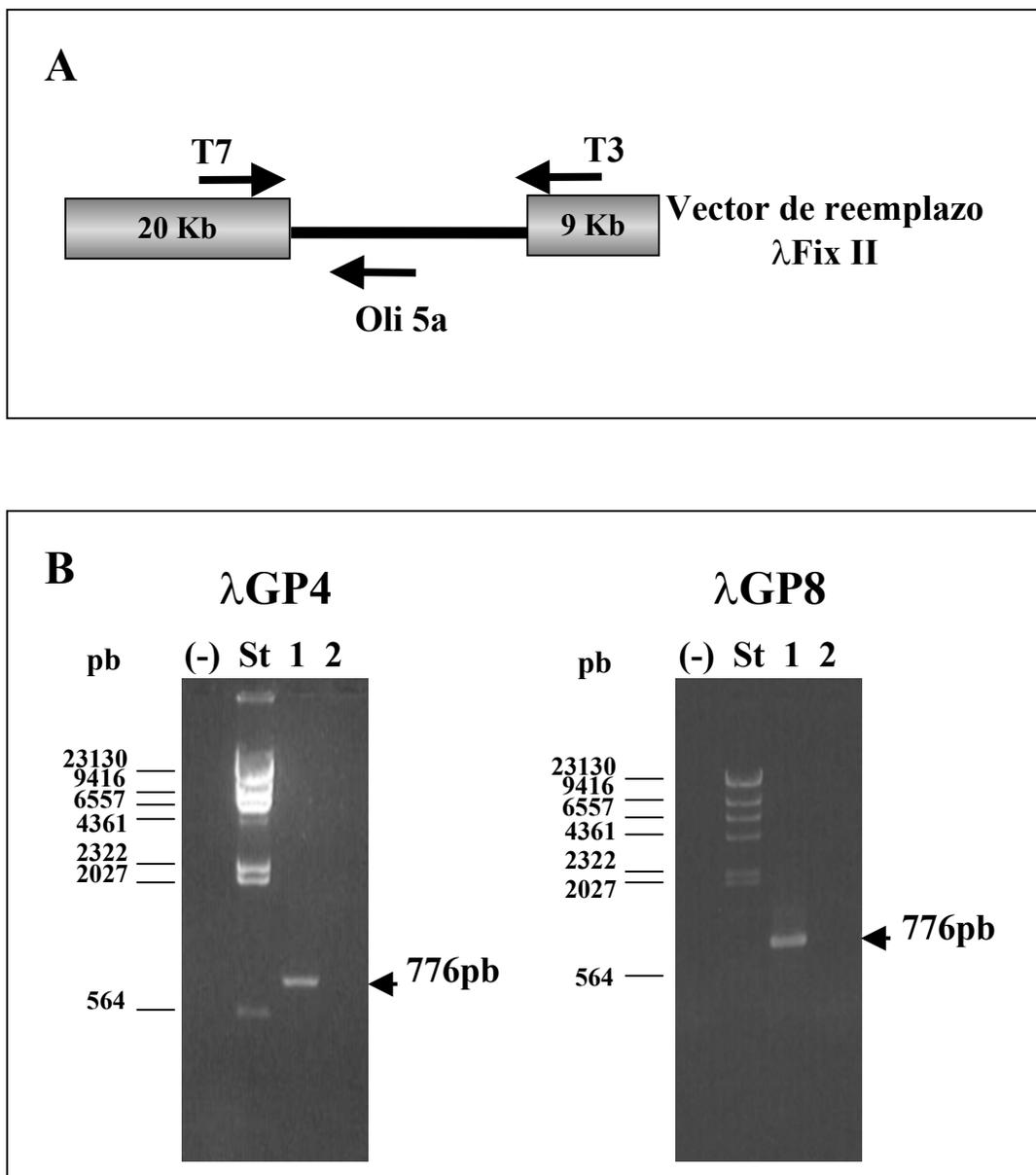
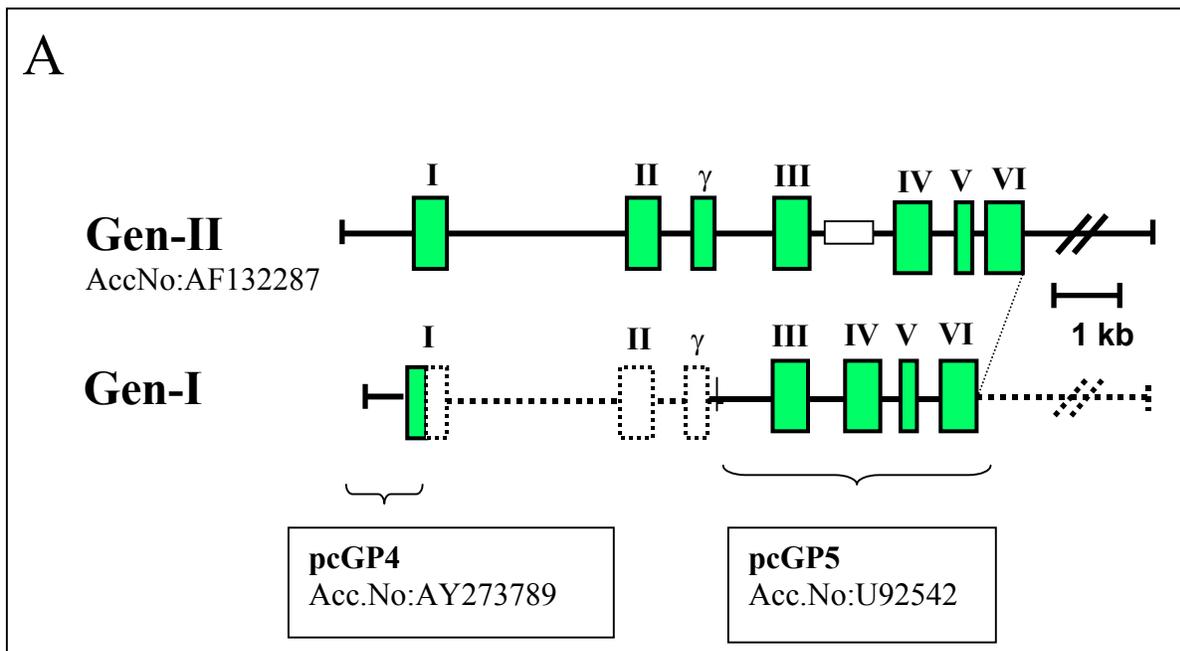


Fig. 2. Aislamiento de la secuencia promotora del gen-I de Pit-1 de carpa. **A:** Esquema de la estrategia utilizada para el aislamiento de la secuencia promotora por PCR a partir de los clones genómicos λ GP4 y λ GP8. Los oligos T7 y T3 fueron cada uno utilizados en combinación con el oligo cPit-1-5a en cada templado. **B:** Gel de agarosa al 1.5 % teñido con BrEt mostrando el fraccionamiento de los productos de PCR. El carril (-) muestra el control negativo sin templado; en carril 1 se muestra producto de PCR con cada uno de los clones usados como templado utilizando como partidores oli cPit-1-5a y oli T7 con los cuales se obtuvo fragmentos de amplificación de 776 pb; en carril 2, los mismos templados, usando partidores cPit-1-5a y oli T3. Se muestra además el marcador de tamaño molecular λ /HindIII (St).



B

1	15	30	45	60										
ATGATTTAATC					60									
GCCCCAT					120									
CACAAAAATAATCATGAAACACAGAAATTTTCATGTAAAGAAATACCAAACCATTTGTTTCA					180									
GTTAACATACAGTATATGTATGTGTGATTTTAAATGTAAAATATTGATGTTGAATTAATAA					240									
ACATGGACATGTTAGAAATTTATAAATATAAATAAATTTATAAATATTCATGTGCTCCTC					300									
TTT ATTCTTTATTACTATACTATGGTTTAATACT CATGCATTTTTTTTTTTTCGTGTCATA					360									
CATTCAGTGATAACTCCATACTTATGCAACTGGACACATTCCTCTATGCATCTCAAATG					420									
TAG ATGTAAACACATCCCTTAAACGGCTAATTAATCTTAAGTCCCATAAGCCGTGGTTTGT					480									
CAGAGCTGTCGCTGGTGTGTTGTTGGAAGCCACACAGTGGAAGTGGACAGTATCAGATT					540									
GCACCTCTTTGCCCTAATTACCAGAGCTTTGCCTCAGCGGGCCGTCATGGTTTGTTAACA					600									
GCAAGAGCTCATTAACAGGGATGGAGGGGCTGAGGGGCTCAGTATAAATACCTGCACA					660									
CGCCCTGCTCGTGTACACAGGTG TGCCGATGCCTCGTGTGCAGGACTCAGACCCTG AGG					720									
TGAAGATCTAGAGTCATGACCTGCCAGGCCTTCAGCACCCTGATTGCTTCACTAC					776									
	M	T	C	Q	A	F	S	T	T	D	C	F	T	T

Fig 3: Secuencia promotora del gen-I de Pit-1. A: Representación esquemática de las copias del gen de Pit-1 de carpa. El gen-II (Acc. No:AF132287) se encuentra totalmente secuenciado, el cuarto intrón presenta una secuencia tipo transposon que no se encuentra en el gen-I (Kausel et al., 1999). La secuencia del clon pcGP5 (Acc.No: U92542) que contiene los exones III al VI, corresponde al gen-I. Las regiones que no están secuenciadas del gen-I se representan por líneas punteadas. **B:** La secuencia del clon pcGP4 (Acc.No: AY273789) contiene 40 pb del primer exón y 736 pb de región promotora. En amarillo se destaca las regiones idénticas con la secuencia del gen-II.

```

1
II gagctctaatacgcactcactatagggcgtcgactcgatcacacattgaccttttgtgacaacatgccccattagcgcastcactcatggt 90
I -----cgactcactatagg-cg-cgactcgatcacacaatgacctttt-taacaacatgccccat----- 67
          11                                     67

//→

631
II cagaattctttattactataccatgggttaataactttaaaattagtaataaccacaaagctttttttatactcatgcacttataataaatc 720
I ----attctttattactatacatggttttaatact----- 334
      303                                     334

721
II ctaaattttccatcatatattcaatgataacttcattatattatgtaatcagactcattccctcattgcatctaaaatgtatctaaatgta 810
I -----atgta 428
                                           424

811
II aacacatcatgaaatggctaattaatcttaagtcccataagccgtggtttgtcagacgtgtcgctgggtgtttgtgtacgccccacacag 900
I aacacatccttaaaaggctaattaatcttaagtcccataagccgtggtttgtcagagctgtcgctgggtgtttgttgaaagccacacacag 518

901
II tggaaagtgacagtatcagattgcacctctttgccctaattaccagagctttgcctcagtgggcggcgcgcgcatgggttgtaacagcaagag 990
I tggaaagtgacagtatcagattgcacctctttg-cctaattaccagagctttgcctcagtgggcggcgcgcgcatgggttgtaacagcaagag 607
                                           AP-1          CREB

991
II ctcattaacatgggatgaggtgggtctgagggggctcagtataaatacctgcacacgcccctgctcatagcacacaggtgggaccctgagtag1080
I ctcattaacaggggatgagggggctgagggggctcagtataaatacctgcacacgcccctgctcgtgtgtcacacaggtgtgcccgatgacctg 697
      Pit-1                                     MTF-1          +1

1081
II -----gaccctgagtaggtgaagatctagagtcATGACCTGCCAGGCCTTCAGCACCCTGATTGCTTCACTACT 1150
I tgtgcaggactcagagcctg--aggtgaagatctagagtcATGACCTGCCAGGCCTTCAGCACCCTGATTGCTTCACTAC- 776
      MTF-1

```

Fig. 4: Alineamiento de secuencias de los genes de Pit-1. Los nucleótidos diferentes del gen-I son resaltados en amarillo: 50 % de secuencia gen-I (Acc.No.AY273789) no aparece con gen-II (Acc.No.AF132287). El sitio de inicio de la transcripción en el gen-I está marcado +1 en negrita. Sitios propuestos para la unión de factores de transcripción AP-1, CREB y MTF-1 al extremo 5' del ATG están subrayados y sitios de unión para Pit-1 están en negrita y subrayados (utilizando los programas TESS, MatInspector). //→ indica un gap de 660 nt del gen-II que no aparece con el gen-I.

```

1
hum -----AAGTTGTCAAAT-----AAGGTTTCAGATTTCTCCCTTCCCTCCATCT--ATAC 48
mou -----TATTGAAGATGCCAAAT-----AAAGTTTCTGTCTTT-GCCTGCTCCTCACTTT--GTAC 52
rat -----TTCCCACTTATTGACGT---CAAAT-----AAAGTTTCTGTTTTTGCCTTCTCCTCAC TTC--GTAC 58
tur -----CTAATTGAATATATTTGTCAAAT-----CATGTCCCTGGTTTCCCTCTTCTTCTCTC----- 51
Cc2 -----TCATTGCA-T---CTAA-----AATGTATCTAAATGTAACACATCATGAA-----AT-- 44
Cc1 -----GCA-T---CTCA-----AATGT---AGATGTAACACATCCTTAA-----AC 35
ZF AATCGAAAATACTGAAAATTGCTAATTTACTGATATTTTTACAGTGTATGCAATCTTCATCACTTGCATCTTTCCGTGAATGTAACAC 90

hum CCCAGAATCAGCTTCTCTTCTGCCATGGATTATGTTTGGGGTAAAAAGGAAGACGGTTCAGATTGATAA----AGCAACTACTCTGG 133
mou GTCATAACCAGGCTTCTCCTTGGGCACAGACAGATATTTGGGT----AAGTAAGACAGTTCGAGTTGACAA----AGCAACTACTCTGT 132
rat GTCACAACCAGGTTTCTCCTGGGCACAGATAGTATTTGGGT----AAGAAAGACAGTTCGGGTTAAACAA----AGCAACTACTCTGG 138
tur --C---CCTG---CTAATTGGACATGATTTGTGTTGTGTGGG--AAGGAAGGAGGCTCTATAGCAGGAC----AGCAATATTGTCTGG 125
Cc2 GGC-TAATTA---TCTTAAGTCCCATAAGCCGTGGTT-TGTCAG--ACGT--GTCGCTGGTGTGTTGTA---CGCCCCACACAGTG 121
Cc1 GGC-TAATTA---TCTTAAGTCCCATAAGCCGTGGTT-TGTCAG--ACGT--GTCGCTGGTGTGTTGTA---AGCCACACACAGTG 112
ZF AGC-TAATTA---TCCTAAATCTCTAATCCCGGTT-TGTCGG--CGCA-GTCGCTGGTCTTTGTTAGAATTAAGCCACACAGTTTT 171

hum G-----AAAAGACTATTAACATGTATAAAGGGATTTCTCTCAGTATAAAATACTA-GCGC---GCACCTCCTGGT--GCCT-CAG-- 207
mou GGGGAAAAAAACTATTAACATGTATAAATGGATTTCTCAGTATAAAATACTA-GCCT---GCACCTCCGGGT--GCCT-CAG-- 212
rat G-----AAAAAATATTAACATGTATAAATGGATTTCTCAGTATAAAATACTA-GCCT---GCACCTCCTGGT--GCCT-CAG-- 213
tur G-----AAAAGAACATTAATGGATAAAGGGATTTCTAGTGGTATAAAATACCT-GCAC---ACGACCTCCCTGT--TCTC-TGG-- 199
Cc2 G-----AAGTGGACAGTATCAGATTGCACCTCTTTGCCCTAATTACCAGAGCTTTGCCTCAGTGGGCCGTCATGGTTTGCTAACAGCA 205
Cc1 G-----AAGTGGACAGTATCAGATTGCACCTCTTTGCC-CTAATTACCAGAGCTTTGCCTCAGCGGGCCGTCATGGTTTGTTAACAGCA 195
ZF A-----AACACAGCCATATCAGATTGCAGCTATTCTTC-CCAATTCCTTAGGA-GGCT-----GT--TCTA----- 231

hum AGCCTTCCTG---ATGTATATA---TGCAAGTAGT-----AGAATGA-ATCGGCCCTT--TGAGACAGTATA---TAATAAAAC 279
mou AGCTGTCTG---ATGTATATA---TGCAAGTAGT-----AGAAGTGA-ATCAGCCCTT--TGATACAGTATA---TAATAAAAGT- 283
rat AGCCGCCCTG---ATGTATATA---TGCAA-TAGGG---AGCCGTGA-ATCGGCCCTT--TGATACAGTATA---TAATAAAAGC- 283
tur AGTCCTTCTGTATATGTATATAACAAGTGCAAATACTGGAAT-AGGTTGG-AGCTGCCATTAATCGCTCAGGACC---TGATCAGTTAG 283
Cc2 AGAGCTCATTAACATGGATGAG---GTGGTCTGAGGGGGCTCATATAAATCCTGCACAC---GCCCTGCTCATA---GCACACAGGTG 286
Cc1 AGAGCTCATTAACAGGGATGGAG---GGGGTCTGAGGGG-CTCATATAAATCCTGCACAC---GCCCTGCTCAGT---TCACACAGGTG 276
ZF TGGGCTCATTAACATGGATGAA---GGGGTCTGAGGGG-CTCCGTATAATACCTGCAGTT---GCCAGTCTTTGTGTCAACAGGTG 313
Pit-1

hum T---GA-TTTGGGAGCAGCGGTTCTCCTATTTTTCTACTCTCTGTGGGAATG 330 hum:Homo sapiens,N°D11333(787-1116)
mou ---GA-ACTGGCAAGCAGCGGTTCT---TAGTTTTCTACTTTCTGTGGGAATG 330 mou:Mus musculus,N°D12886(1-330)
rat ---GG-ACTGGCAAGCGGTTCTCT---TAGTTCTACTCTCTGTGGGAATG 330 Rat:Rattus norvegicus,N°X56085(2-331)
tur A---AA-ACAGGGAAG-GGTGGCTCT--TTGCCTTTCACCTGT-TTGAGGGCATG 330 tur:Meleagris gallopavo,U62732(179-508)
Cc2 GGACCTGAGTAGGACCTGAGT-----AGGTGAAGATCTAGAGT-CATG 330 Cc2:Cyprinus carpio,N°AF132287(782-1111)
Cc1 TGCCGATGCTCGTGTGACGACTCAGACCTGAGGTGAAGATCTAGAGT-CATG 330 Cc1:Cyprinus carpio,N°AY273789(409-738)
ZF -GCCGATG-----AAGAGT-CATG 330 ZF :Danio rerio, clonado in silico.

```

Fig.5. Alineamiento de secuencias promotoras del gen Pit-1 de especies de mamíferos, aves y peces. En el análisis se utilizaron 330 nt río arriba del ATG de cada secuencia, los números de acceso se muestran a un lado de la figura, la secuencia del gen de Pit-1 de ZF fue extraída desde contigs no ensamblados disponibles en el banco de datos de secuencias no prosadas de pez cebra. Las probables cajas TATA se muestran en cuadros rojos. Posibles sitios de unión de Pit-1 se muestran en negrita y subrayados (utilizando programas en el caso de los peces e información de los números de acceso del banco de datos en caso de humano, ratón, rata y pavo).

El sitio de inicio de la transcripción se determinó por “run off” transcription utilizando un partidador antisense Pit-1-5a del primer exón del gen de Pit-1 de carpa. Se observó un solo tamaño de transcrito y este, al ser fraccionado en paralelo con una reacción de secuenciación con este mismo oligonucleotido del gen-I, coincidió con una G en posición 29 nucleótidos río abajo del TATA-box (nucleótido 673 del gen-I, Fig.4). No se observaron otros tamaños de transcrito, lo que sugiere que no hay variantes río arriba del oligo utilizado (manuscrito en preparación).

El análisis de la secuencia promotora del gen-I con dos programas para identificar sitios de consenso de unión de factores de transcripción: TESS y MatInspector, reveló secuencias de unión para gran cantidad de factores de transcripción, pero en este trabajo se seleccionó Pit-1 (y algunos asociados), AP-1, CREB y MTF-1 (Fig. 6 y 7). Al hacer un paralelo de los resultados entregados por ambos programas se pueden notar diferencias en los resultados entregados por cada uno debido a las diferentes parámetros utilizados por cada uno.

Posibles sitios de unión para factores como GHF-1, OCT-1 y Pit-1a son informados por TESS independientemente y al revisar la posición en la que se une cada uno es posible ver que algunas posiciones coinciden (por ejemplo, GHF-1: N₁₀₉ATAATCAT₁₁₆, Oct-1: N₁₀₆TAAATAATCATGA₁₁₈, Pit-1^a N₁₀₉ATAATCAT₁₁₇). Por lo tanto, en muchos de estos posibles sitios se uniría el mismo factor. Al respecto, es importante notar que GHF-1 es sinónimo de Pit-1 y que Pit-1a es una variante de “splicing” de Pit-1. Pit-1a es una proteína con un inserto de 26 aminoácidos en el dominio de transactivación de Pit-1 producto de un procesamiento alternativo del RNA mensajero de Pit-1 (Morris et al., 1992). Además, Pit-1 pertenece a la familia POU (Pit-1/Oct/unc-86) de factores de transcripción que se unen a secuencias de 8 pb en el DNA para ejercer su función transactivadora (Jacobsen et al.,

1997). Las secuencias consenso de unión de Pit-1 y Oct-1 son muy similares y ambas proteínas regulatorias, por presentar dominios POU, son capaces de unir ambos consensos pero con diferentes afinidades (Peers et al., 1990). Además al comparar las secuencias propuestas para la unión de los distintos factores relacionados con Pit-1 fue posible proponer secuencias consenso basadas en el porcentaje de aparición de cada nucleótido en una posición específica (GHF-1: T_{62%} T_{62%} A_{100%} T_{87%} T_{48%} C_{54%} A_{100%} T_{85%}, Oct-1: W A_{71%} T_{57%} A_{57%} T_{62%} A_{86%} A_{86%} W C_{57%} A_{86%} T_{57%} R W, Pit-1a: A_{44%} T_{89%} A_{100%} T_{67%} T_{56%} C_{100%} A_{100%} T_{78%}). De esta manera es posible observar la frecuencia promedio en que se encuentra un nucleótido en una cierta posición en un probable sitio de unión informado por el programa. Este programa entregó 5 sitios posibles en orientación sentido (N= sentido 5'-3') y 3 en orientación antisentido (R= sentido 3'-5') para AP-1; para MTF-1 dos sitios en orientación sentido y dos en orientación antisentido (Fig. 6).

En el caso de MatInspector los posibles sitios de unión entregados como resultado del análisis en la misma secuencia (gen-I de Pit-1) fueron menores en número que los resultados entregados por TESS. Por ejemplo, MatInspector entregó tres probables sitios de unión para Pit-1/GHF-1 en sentido N y reportó 8 sitios probables para Oct-1. En TESS el número de resultados entregados es mayor, por ejemplo, para GHF-1 informó 13 probables sitios en orientación sentido y 9 probables sitios de unión en orientación antisentido. Además, MatInspector reportó 3 sitios probables de unión para CREB en orientación sentido y dos en orientación antisentido. Un posible sitio para la unión de AP-1 al igual que para MTF-1. Los mayores porcentajes de aparición de nucleótidos en los probables sitios de unión de factores de transcripción informados por este programa son para Oct-1 T_{50%} T_{63%} A_{100%} W T_{50%} T_{75%} A_{75%} A_{65%}, para Pit-1 T_{67%} T_{67%} A_{100%} T_{100%} G_{67%} C_{100%} A_{100%} T_{67%} y para CREB: C_{60%} C_{60%} T_{60%} G_{80%} T_{60%} A_{80%} M A_{60%} R (Fig. 7).

La comparación de los resultados entregados por ambos programas permitió construir un esquema de algunos de los posibles elementos-trans (factores de transcripción) que se unirían a la secuencia promotora del gen-I de Pit-1, utilizando los sitios de mayor probabilidad de unión y las coincidencias en posibles sitios de unión entregados por ambos programas (Fig. 8). Sitios de unión para Pit-1, AP-1 y CREB también fueron reportados en la secuencia promotora del gen-II por Kausel et al., 1999 (Pit-1, nt 134-141, 297-304, 994-1001; AP-1, nt 768-776; CREB, nt 965-970), pero no los sitios de unión para MTF-1.

Se estudiaron secuencias promotoras de genes que son regulados por Pit-1 disponibles en el banco de genes, en busca de posibles sitios de unión de Pit-1, utilizando la información entregada en el mismo número de acceso o usando el programa TESS. Todas las secuencias analizadas fueron estudiadas río arriba del ATG para cada una y los sitios antisentido fueron arreglados (secuencia inversa y complementaria) para permitir su alineamiento con sitios en orientación sentido.

En las secuencias promotoras del gen de Pit-1 se estudiaron promotores de humano, gen-I y gen-II de carpa y pez cebra (Fig. 9). En el promotor del gen de Pit-1 humano se escogió tres sitios posibles de autorregulación y todos presentaron la siguiente secuencia: TTATACAT. En peces se emplearon secuencias promotoras del gen-I (Acc N° AY273789) y gen-II (Acc. N° AF132287) de Pit-1 de carpa y del gen de Pit-1 de pez cebra clonado *in silico*, el alineamiento de los sitios de peces permitió deducir una secuencia consenso para la unión de Pit-1 en genes de Pit-1 de estos peces: WHWWDCAW (Fig. 9).

Se estudiaron también los promotores de genes de prolactina (PRL) (Humano, carpa y trucha arcoiris), hormona del crecimiento (GH) (humano, carpa y salmo salar) y somatolactina (SL) (salmón chum) (Fig. 10). Los sitios de unión de Pit-1 en la secuencia promotora del gen de PRL en humano alineados mostraron la siguiente secuencia consenso:

WTATTCAW, mientras que en las secuencias de carpa y trucha arcoiris alineadas el consenso fue: WTWWNCAT. Para la secuencia promotora del gen de GH humano se escogieron sitios que alineados mostraron el siguiente consenso: TTATKCAT, además los sitios escogidos en secuencias de carpa y salmón del atlántico (*Salmo salar*) mostraron la siguiente secuencia consenso: TTATNCAT. En el caso del gen de SL sólo se encontró una secuencia del pez salmón chum y al ser alineados los sitios de unión de Pit-1 se obtuvo la siguiente secuencia consenso: TTATNCAT.

Por lo tanto, el análisis realizado mostró que la principal diferencia entre los genes de humano en el octámero del sitio de unión para Pit-1 se encuentra en la quinta posición, esto es, para el gen de Pit-1 TTATACAT, para PRL: WTATTCAT y para GH: TTATSCAT, manteniéndose la secuencia consenso WTATNCAT. En el caso de los peces, las diferencias son más evidentes presentándose las principales diferencias en la primera y quinta posición de la secuencia octamérica reconocida por Pit-1 en los promotores estudiados, pero manteniéndose la siguiente secuencia consenso: (A ó T)TATNCAT. Así entonces, este estudio confirma la secuencia consenso de unión de Pit-1 informada por otros autores (Yamada et al., 1993; de la Hoya et al., 1998) y determinó la ubicación exacta de los sitios más probables de los genes de carpa y de pez cebra. Además, este estudio muestra que no existen diferencias importantes en la secuencia consenso para la unión de Pit-1 entre los promotores de las especies de peces estudiadas ni entre los promotores de humano y peces (Fig. 10).

TESS

GHE-1

N 109 **ATAAT**TCAT₁₁₆
 N 128 **ATAAT**TCAT₁₃₅
 N 194 **ATATG**TAT₂₀₁
 N 260 **TTATAA**T₂₆₇
 N 274 **TAATT**TAT₂₈₁
 N 278 **TTATAA**T₂₈₅
 N 284 **ATATT**TCAT₂₉₁
 N 334 **TCATG**CAT₃₄₁
 N 356 **TCATA**CAT₃₆₃
 N 382 **TTATG**CA₃₈₉
 N 405 **CTATG**CAT₄₁₂
 N 447 **TAATT**AAT₄₅₄
 N 609 **TCATT**AAC₆₁₆

T62% **T**62% **A**100% **T**87% **T**48% **C**54% **A**100% **T**85%

OCT-1

N 106 **TAAATAAT**CATGA₁₁₈
 N 125 **AAAATAAT**CATGA₁₃₇
 N 143 **AGAAATTT**CATGTA₁₅₆
 N 151 **CATGTAAAGAA**T₁₆₃
 N 152 **ATGTAAAG**₁₅₉
 N 259 **TTTATAAATATAA**₂₇₁
 N 423 **GATGTAAACACAT**₄₃₅

WA71% **T**57% **A**57% **T**62% **A**86% **A**86% **WC**57% **A**86% **T**57% **RW**

Pit-1a

N 109 **ATAAT**TCAT₁₁₇
 N 128 **ATAAT**TCAT₁₃₆
 N 282 **AtATATTC**AT₂₉₁
 N 284 **ATATTC**AT₂₉₁
 N 284 **WTATY**CAT₂₉₁
 N 285 **TATTC**AT₂₉₁
 N 334 **TCATG**CAT₃₄₁
 N 382 **TTATG**CA₃₈₉
 N 427 **TAAACAC**₄₃₃

A44% **T**89% **A**100% **T**67% **T**56% **C**100% **A**100% **T**78%

MTF-1

N 655 **TGCACAC**₆₆₁
 N 697 **GTGTGCA**₇₀₃

AP-1

N 11 **CGACT**CA₁₈
 N 476 **TTTGT**CA₄₈₂
 N 570 **TGCCT**CA₅₇₆
 N 730 **AGAGT**CA₇₃₆
 N 730 **AGAGT**CA₇₃₆
 N 766 **TGCTT**CA₇₇₂

T50% **G**83% **A**50% **G**50% **T**100% **C**100% **A**100%

R 1 **ATGATTTA**₈
 R 105 **GTA**AATAA₁₁₂
 R 196 **ATGTATGT**₂₀₃
 R 258 **ATTTATAA**₂₆₅
 R 262 **ATAAATAT**₂₆₉
 R 276 **ATTTATAA**₂₈₃
 R 280 **ATAAATAT**₂₈₇
 R 286 **ATTCATGT**₂₉₃
 R 336 **ATGCATTT**₃₄₃

R 94 **AAATCTTTACTGT**₁₀₆
 R 152 **ATGTAAAG**₁₅₉
 R 213 **ATGTAAAA**₂₂₀
 R 277 **TTATAAATATTCAT**₂₉₄
 R 296 **TCCTCTTTATTCT**₃₀₈
 R 303 **TATTCCTTTATTAC**₃₁₅
 R 306 **TCCTTTATTACTAT**₃₁₈
 R 543 **ACCTCTTTGCCCT**₆₅₅
 R 552 **CCCTAATTACCAG**₅₆₄
 R 606 **AGCTCATTAACAG**₆₁₈

R 1 **ATGATTTA**₈
 R 221 **TATTGAT**₂₂₇
 R 285 **TATTCAT**₂₉₁
 R 336 **ATGCATTTTTT**₃₄₅
 R 383 **TATGCA**₃₈₉
 R 407 **ATGCATC**₄₁₃

R 655 **TGCACAC**₆₆₁
 R 697 **GTGTGCA**₇₀₃

R 2 **TGATTTA**₉
 R 570 **TGCCT**CA₅₇₆
 R 730 **AGAGT**CA₇₃₆
 R 730 **AGAGT**CA₇₃₆
 R 730 **AGAGT**CA₇₃₆
 R 766 **TGCTT**CA₇₇₂

Fig.6. Posibles sitios de unión en la secuencia promotora del gen-I, según TESS. Los nucleótidos en azul se ajustan bien pero no perfectamente a la secuencia consenso utilizada por el programa, aquellos en rojo no lo hacen. Los nucleótidos más frecuentes en las secuencias son indicadas en negrita con sus porcentajes.

MatInspector

OCT-1

Octamer binding site (OCT1/OCT2 consensus)	N	149	ttc ATGT aaagaat	163
POU-factor Tst-1/Oct-6	N	228	gttg AATT aaaaaac	242
Octamer-binding factor 1, POU-specific domain	N	280	ataaat ATTC atg	292
Octamer-binding factor 1	N	381	ctt ATGCa actggac	395
Octamer-binding factor 1	R	142	t ACAT gaaatttctg	156
Octamer-binding factor 1	R	177	tg atg tt AACT gaa	191
Octamer-binding factor 1	R	455	ctt atgggACTT aag	469
Octamer-binding factor 1	R	553	g ctctg gt AATT agg	567

T50% **T**63% **A**100% **WT**50% **T**75% **A**75% **A**65%

Pit-1

Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	N	282	aat ATT Catg	292
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	N	332	actc ATGC att	342
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	N	380	actt ATGC aac	390

T67% **T**67% **A**100% **T**100% **G**67% **C**100% **A**100% **T**67%

CREB

E4BP4, bZIP domain, transcriptional repressor	N	144	gaaatt catGTAA agaaata	164
E4BP4, bZIP domain, transcriptional repressor	N	205	tgattt aatGTAA aatattg	225
Tax/CREB complex	N	386	gcaact GGAC acatt ccct t	406
hepatic leukemia factor	R	375	gtcca GTTG cataagtatgga	395
activating transcription factor	R	573	aaacca TGAC gcccctgag	593

C60% **C**60% **T**60% **G**80% **T**60% **A**80% **MA**60% **R**

AP-1

NF-E2 p45	N	565	agctt gccTCAG cgggcccgt	585
-----------	---	-----	--------------------------------	-----

MTF-1

Metal transcription factor 1, MRE	N	652	acct GCAC cagccct	666
-----------------------------------	---	-----	--------------------------	-----

Fig.7. Probables sitios de unión en la secuencia promotora del gen-I, según MatInspector.

Los nucleótidos marcados en rojo muestran una alta conservación en esa posición según las matrices usadas por MatInspector. Los nucleótidos en letras capitales denotan la secuencia consenso tomada como referencia por este programa. Los nucleótidos más frecuentes en las secuencias son indicadas en negrita con sus porcentajes. **Simbología:** **R** = G-A; **Y** = C-T; **W** = A-T; **M** = A-C; **K** = G-T; **S** = C-G; **H** = A, C-T; **V** = A, C-G; **B** = C, G-T; **D** = A, G-T; **N** = G, A, T-C.

Pit-1

Humano	656	CATAT <u>TTATACAT</u> TTGCA ₆₇₃	(Acc.N°D11333)
	947	TCCCT <u>TTATACAT</u> GTTAA ₉₃₀	(Acc.N°D11333, reveso y comp.)
	594	TAGTA <u>TTATACAT</u> AATTT ₅₇₇	(Acc.N°D11333, reveso y comp.)
Ratón	229	TGTAT <u>ATATGCAA</u> GTACG ₂₄₆	(Acc.N°D12886)
	171	TCCAT <u>TTATACAT</u> GTTAA ₁₅₄	(Acc.N°D12886, reveso y comp.)
	240	TGCAT <u>ATATACAT</u> CAGGA ₂₂₃	(Acc.N°D12886, reveso y comp.)
Carpa-I	279	TATAA <u>ATATTCAT</u> GTGCT ₂₉₆	(Acc.N°AY273789)
	329	AATAC <u>TCATGCAT</u> TTTTT ₃₄₆	(Acc.N°AY273789)
	377	CATAC <u>TTATGCAA</u> CTGGA ₃₉₄	(Acc.N°AY273789)
Carpa-II	989	AGCTC <u>ATTAACAT</u> GGATG ₁₀₀₆	(Acc.N°AF132287)
	292	TGTAG <u>TAAATCAT</u> ATTTT ₃₀₉	(Acc.N°AF132287)
	146	CTTTA <u>AAAATCAT</u> GTTCA ₁₂₉	(Acc.N°AF132287, rev. y comp.)
zebrafish	427	TTTT <u>C TTATACAT</u> TATAT ₄₁₀	
	667	TTCAT <u>TCATTCAT</u> TCATT ₆₈₄	
	658	TAAAA <u>ACATTCAT</u> TCATT ₆₇₅	

Fig. 9. Secuencias de sitios de unión de Pit-1 en regiones promotoras de genes de Pit-1.

La secuencia principal de 8 nucleótidos reconocida por Pit-1 se encuentra en negrita y subrayada.

Simbología: R = G ó A; Y = C ó T; W = A ó T; M = A ó C; K = G ó T; S = C ó G;

H = A, C ó T; V = A, C ó G; B = C, G ó T; D = A G ó T; N = G, A, T ó C.

PRL

Humano 708 CCTAA**TTAATCAA**AATCC725 (Acc. N°X00368)
 779 ATTT**C TTATTCAT**ATTCA762 (Acc. N°X00368, rev, comp)
 864 TCATT**ATATTCAT**GAAGA881 (Acc. N°X00368)

Carpa 38 CAATG**TTTTTCAT**TAGTT55 (Acc. N°X52881)
 88 TTTGT**ATATGCAA**TGAGT105 (Acc. N°X52881)

Trucha Arc. 179 ATCAA**ATAAACAT**CTAAC196 (Acc. N°X95907)
 339 TAAAT**GATTTCAT**TTAAA356 (Acc. N°X95907)
 350 ATTTA**AAAATCAT**ATTAA367 (Acc. N°X95907)
 451 TAAAA**AATACCAT**GGGTA468 (Acc. N°X95907)
 502 AAATG**TTTCTCAT**TAGTG519 (Acc. N°X95907)
 559 CAGAC**TTATGCAT**TCACA576 (Acc. N°X95907)

GH

Humano 212 CTAAAT**TTATCCAT**TAGCA229 (Acc. N°X05244)
 261 TACAT**TTATGCAT**GGGGC244 (Acc. N°X05244, rev, comp)

Carpa 44 TGGCT**ATTTCCAT**GA CTC27 (Acc. N°X51969, rev, comp)
 116 TTTGAT**TTATGCAT**TGCTG99 (Acc. N°X51969, rev, comp)
 146 AACTC**TCATGCAT**TAAGA163 (Acc. N°X51969, rev, comp)

Salmon 76 CAATA**ATATGCAT**ATCCT93 (Acc. N°X61938)
 (*Salmo salar*) 95 CAAGG**ATATGCAT**ATTAT78 (Acc. N°X61938, rev, comp)
 1129 TCGTT**TTATACAT**TTGTT1146 (Acc. N°X61938)

SL

Salmon chum 72 GATAA**TTCTTCAT**AAAAC55 (Acc. N°D10636)
 63 AAGAA**TTATCCAT**GCTCT80 (Acc. N°D10636, rev, comp)
 278 CACCA**TAATACAT**CAATT261 (Acc. N°D10636, rev, comp)
 507 CCTTT**ATATGGAT**TCAAC490 (Acc. N°D10636, rev, comp)

Fig. 10. Secuencias de sitios de unión de Pit-1 en promotores de genes blanco. La secuencia principal de 8 nucleótidos reconocida por Pit-1 se encuentra en negrita y subrayada. **Simbología:**

R = G ó A; **Y** = C ó T; **W** = A ó T; **M** = A ó C; **K** = G ó T; **S** = C ó G; **H** = A, C ó T; **V** = A, C ó G; **B** = C, G ó T; **D** = A G ó T; **N** = G, A, T ó C.

4.4 Comparación de las secuencias regulatorias de genes Pit-1 de carpa - diferencia específica entre Gen-I/Gen-II.

Las secuencias regulatorias de los dos genes, entre la caja TATA y el ATG, son diferentes. En el gen-I, esta región tiene 94 nucleótidos, mientras que en el Gen-II es de 84 nucleótidos (Fig. 11, parte superior). Dentro de esta región se encuentra una secuencia próxima única para cada gen que, en el caso del Gen-I tiene una extensión de 33 nucleótidos y en el Gen-II de 23 nucleótidos (Fig. 11, color rojo y azul, respectivamente). Un análisis de esta región particular utilizando TESS en busca de posibles sitios de unión de factores de transcripción que pudieran dar una explicación funcional a esta diferencia, fue realizado para ambas copias del gen Pit-1 de carpa (Fig.11, parte inferior). Este análisis arrojó 36 posibles sitios de unión para 31 factores de transcripción distintos en la secuencia de 33 nucleótidos del Gen-I, mientras que en los 23 nucleótidos del Gen-II, entregó un total de 8 probables sitios que serían reconocidos por sólo 5 distintos factores de transcripción. El factor que según el análisis presenta mayor probabilidad de unión en la región del Gen-I es el factor de transcripción MTF-1 y corresponde a la misma secuencia del sitio MTF-1 río arriba del sitio de inicio de la transcripción pero con orientación inversa. Ese sitio de unión no existe en la región correspondiente del Gen-II.

Gen-I └─▶ +1
TATAAA FACCTGCACACGCCCTGCTCGT **GT**CACACAGGTG **TGCCGATGCCTCGTGTGCAGGACTCAGACCCTG**AGGTGAAGATCTAGAGTCATG
TATAAA FACCTGCACACGCCCTGCTCATAGCACACAGGTG **GGACCCTGAGTAGGACCCTG-AGT**-----AGGTGAAGATCTAGAGTCATG
 Gen-II

Gen-I

Gen-II

TGCCGATGCC TCGTGTGCAG GACTCAGACCCTG 33

===== (7.7899) GATA-1
 ===== (7.2899) GATA-2
 ----- (6.7553) HSF2
 ----- (6.8553) USF
 ----- (6.8553) USF
 ----- (9.6051) CG-1
 ----- (10.7631) GBF/1/2/3
 ----- (9.0755) N-Myc
 ----- (8.9167) V\$USF_Q6
 ----- (6.8338) TAF-1
 ===== (6.5417) T-Ag
 ===== (8.9281) T-Ag
 ===== (12.00) HES-1,USF
 ===== (14.00) **MTF-1**
 ===== (12.00) MBF-1
 ===== (10.8247) MEP-1
 ===== (14.00) **MTF-1**
 ===== (10.0551) Ttk
 ----- (7.6319) Ttk_69K
 ===== (9.8233) LVc
 ===== (8.5397) H-2RIIBP
 ----- (8.3799) c-Jun
 ----- (6.0791) X2BP
 ----- (8.5073) c-Fos
 ----- (7.2758) SKO1
 ----- (6.6847) GCN4
 ===== (8.0081) PR
 ----- (8.9945) c-Fos
 ----- (7.7160) c-Jun
 ===== (12.00) Zeste
 ----- (6.5720) GCN4
 ----- (6.3106) E12
 ===== (6.5661) V\$CAP_01

GGACCCTGAG TAGGACCCTG AGT 23

===== (9.7377) H4TF2
 ===== (14.00) NF-Zc,NF-Zz
 ----- (6.7705) Ttk
 ===== (14.00) C/EBP,C/EBPalpha
 ----- (7.6319) Ttk_69K
 ===== (14.00) NF-Zc,NF-Zz
 ===== (9.7377) H4TF2
 ----- (6.7705) Ttk

Fig 11: Comparación de las secuencias regulatorias de las dos copias del gen Pit-1 de carpa. Se muestran las regiones diferentes de ambas copias en colores, esta zona en el Gen-I tiene una extensión de 33 nucleótidos (en rojo), mientras que en el Gen-II es de 23 nucleótidos (en azul). En la parte inferior de la figura se muestra un análisis de las secuencias únicas proximales de ambas copias del gen usando TESS. Las líneas azules indican la unión a la hebra positiva del DNA y las líneas rojas la unión a la hebra negativa. Se indican por nombre los diferentes factores que se unen a la secuencia y a su costado los valores de máxima afinidad para cada uno y se muestran resaltados los factores con mayor valor de afinidad.

4.5 Análisis de expresión

Las regiones únicas proximales diferentes entre Gen-I y Gen-II, al estar ubicadas luego del inicio de la transcripción, deberían estar presentes en los mensajeros respectivos. Una comparación de las secuencias de cDNA correspondiente a los exones I, II, γ y parte del exón III derivadas de ambas copias mostró un 4% de diferencias a nivel nucleotídico en las regiones codificantes (19 nucleótidos/ 475 nucleótidos total) que se reflejaron en un 5% de sustituciones aminoacídicas (8 aminoácidos/159 aminoácidos total) (Fig. 12, parte inferior). Además se observó que a nivel nucleotídico presentan diferente número de sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *Pst*I, el Gen-I presenta dos sitios de restricción para la enzima *Pst*I (nucleótidos 92-97; nucleótidos 334-339) mientras que el Gen-II sólo presenta uno (nucleótidos 334-339) debido a que el Gen-II presenta una C en vez de una T con lo cual se pierde el primer sitio de restricción (Fig.12 parte inferior).

Se hicieron análisis de expresión para las dos copias del gen Pit-1 por RT-PCR en RNA total de hipófisis de una carpa macho de verano. En cDNA de hipófisis de carpa se realizaron reacciones de PCR con los partidores específicos sentido: oligo cPit-1-6s (oli6s, específico para Gen-I) y oligo cPit-1-7s (oli7s, específico para Gen-II), respectivamente, en conjunto con el oligo antisense cPit-1-3a (oli3a) correspondiente al exón III cuya secuencia es idéntica tanto en Gen-I como en Gen-II (Fig. 12).

En una reacción de PCR se utilizaron los partidores oli7s y oli3a y en la otra reacción de PCR se usaron los partidores oli6s y el mismo oli3a (Fig. 13 A). En ambas reacciones se obtuvo un fragmento de amplificación de 523 pb. El fragmento amplificado correspondiente al Gen-II tratado con *Pst*I originó fragmentos de restricción de 386 pb y

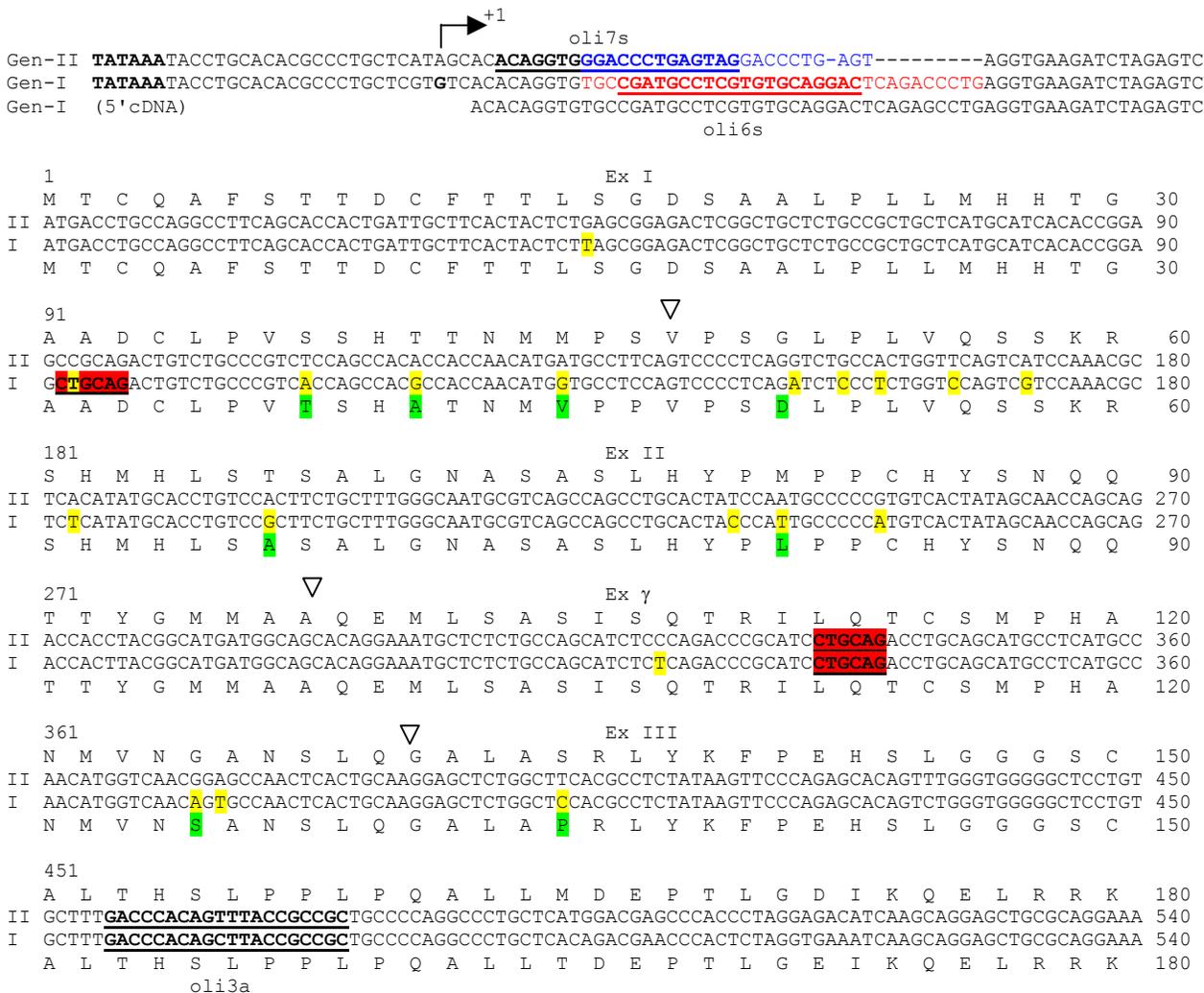
137 pb y el fragmento correspondiente al Gen-I originó fragmentos de restricción de 144 pb, 242 pb y 137 pb en un fraccionamiento en gel de agarosa al 2% (Fig. 13 B). Así, al ser digeridos con *PstI*, los cDNAs, originaron patrones de restricción distintos para cada copia. Esto indica que en el RNA total de hipófisis de la carpa de verano estudiada se encuentran ambos mensajeros expresados.

Se llevó a cabo una cuantificación de las bandas en el gel del RT-PCR (Fig. 13 B) usando un sistema automatizado de análisis de imágenes digitales (UN-SCAN-IT, Silk Scientific, Inc.). Se eligió secciones del gel equivalentes que contenían las bandas de interés y se comparó su número de píxeles menos el background. El número de píxeles totales resultante para las bandas correspondientes al Gen-II y al Gen-I fue comparado para obtener la relación aproximada existente en la expresión de las dos copias, la cual muestra que la expresión del gen-II es 1,4 veces mayor que la del gen-I (Fig. 14).

4.6 Análisis por Southern blot

Para corroborar el número de copias presentes en el genoma de *C. carpio*, se analizó por Southern blot de DNA genómico de carpa digerido con tres distintas enzimas de restricción: *EcoRI*, *HindIII* y *BamHI* (Fig. 15). Como sonda se utilizó el inserto del subclon pGP4₇₇₆ marcado con ³²P y cuya secuencia no es reconocida por ninguna de las enzimas usadas en la digestión del DNA genómico. En el DNA digerido con *EcoRI* se observan claramente dos bandas de hibridación de 3,0 Kpb y 1,5 Kpb (Fig.15, carriles 1-3). Al igual, en el DNA digerido con *HindIII* hay dos fragmentos de intensa hibridación de 6,5 Kpb y 3,0 Kpb (Fig 15, carriles 4-6). La digestión con *BamHI* del DNA genómico (Fig 15, carriles 7-9) produjo fragmentos de mayor tamaño que no se fraccionaron en las

condiciones de la electroforesis y en las señales de hibridación no se puede distinguir que correspondan a más que una banda. La hibridación de la sonda con dos fragmentos del DNA digerido con las enzimas usadas en este experimento podría confirmar que existen dos genes para Pit-1 en el DNA genómico de carpa.



4 % Nucleótidos diferentes Región codificante: (19 / 475)

5 % Aminoácidos diferentes Región codificante: (8 / 159)

Fig.12. Alineamiento de cDNAs derivados de los genes II y I de Pit-1 de carpa. Se muestran también las regiones diferentes para cada copia entre la caja TATA y el ATG, en azul la región del Gen-II de 23 nucleótidos y en rojo la del gen-I de 33 nt. En las regiones codificantes los nucleótidos diferentes están resaltados en amarillo y los aminoácidos diferentes en verde. Subrayados se encuentran los diferentes oligos utilizados en el RT-PCR con los cuales se amplificaron fragmentos de 523pb. Resaltadas en rojo se encuentran las secuencias reconocidas por *Pst*I, el Gen-I posee dos sitios para esta enzima, mientras que el Gen-II sólo posee uno. Los triángulos indican los límites entre exones.

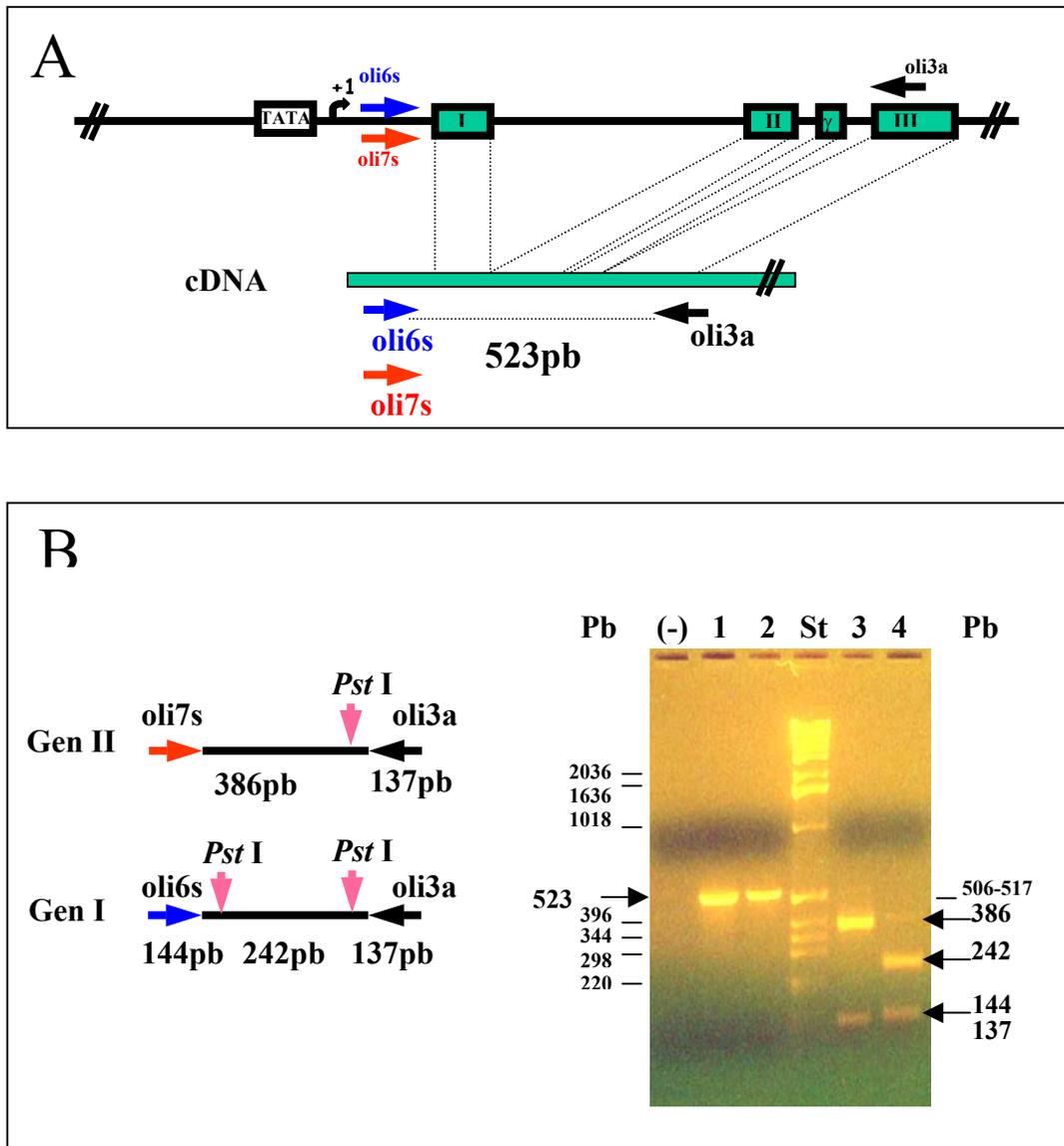


Fig.13. Expresión de ambas copias del gen de Pit-1 de carpa. **A:** En el esquema se muestra la estrategia utilizada para evaluar la expresión de las dos copias del gen Pit-1 de carpa. Se utilizaron los oligos oli7s y oli3a para amplificar el mensajero correspondiente al gen-II, y los oligos oli6s y oli3a para el mensajero del gen-I. **B:** Fraccionamiento de los productos del RT-PCR de los dos genes de Pit-1, se utilizaron las dos combinaciones de oligos en reacciones PCR en cDNA de hipófisis de carpa por separado. En el carril 1 se muestra el producto de PCR para el Gen-II y en carril 2 producto de PCR obtenido para el Gen-I, ambos de 523 pb. En carriles 3 y 4 los productos de PCR correspondientes a los genes II y I respectivamente, digeridos con *Pst*I, originaron distintos fragmentos. Los productos del RT-PCR y sus respectivos productos de digestión fueron fraccionados junto con el estándar 1 Kb DNA Ladder, (Gibco BRL). (-) indica el control negativo sin templado.

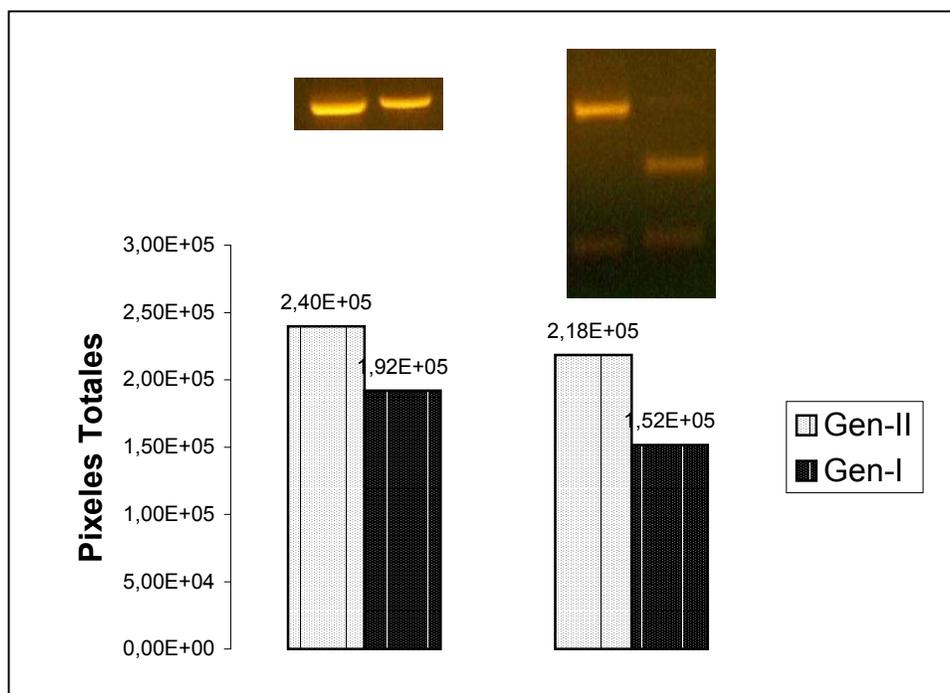


Fig.14. Análisis de la expresión de los genes de Pit-1 usando un sistema automatizado de imágenes digitales. El gráfico muestra la comparación de la intensidad de las bandas (píxeles totales) correspondientes cada uno de los genes de Pit-1 de la figura anterior, usando un sistema de análisis de imágenes UN-SCAN-IT (Silk Scientific, Inc). Arriba se muestran las bandas analizadas. Las barras blancas representan las bandas correspondientes al Gen-II y las barras negras las del Gen-I.

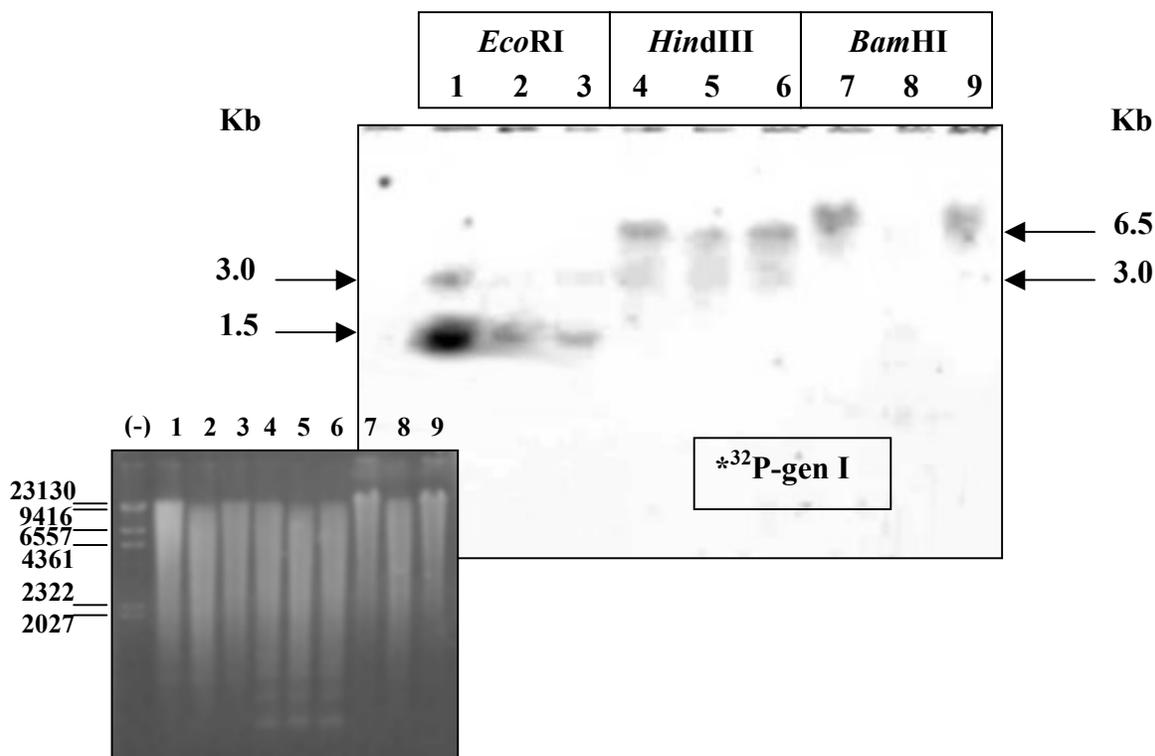


Fig.15. Análisis por Southern Blot en DNA genómico de carpa. Gel de agarosa al 1%, mostrando el DNA genómico de tres individuos digerido totalmente con tres enzimas de restricción, *EcoRI* (carriles 1-3), *HindIII* (carriles 4-6) y *BamHI* (carriles 7-9), se muestran junto al Standard de tamaño molecular λ /*HindIII*. El DNA digerido se transfirió a una membrana de nitrocelulosa e hibridó con el inserto de 776pb del subclón pcGP4₇₇₆ (Gen-I) marcado con ^{32}P . El DNA genómico digerido con *EcoRI* mostró dos señales de hibridación con la sonda de 3.0 y 1.5 Kb. El DNA digerido con *HindIII* también presentó dos señales de 6.5 y 3.0 Kb. El DNA digerido con *BamHI* presentó hibridación con fragmentos de mayor tamaño.

5. DISCUSIÓN

La regulación de la transcripción de genes que codifican para proteínas, involucra la interacción de un gran número de complejos proteicos y factores de transcripción. El control de la expresión de los genes de hormonas hipofisiarias se muestra como un tema de importancia en el entendimiento de la respuesta adaptativa a los cambios estacionales que experimenta el pez *Cyprinus carpio*. Esta se refleja en una modulación de la expresión genica a nivel de transcripción y traducción (Figueroa et al., 1994; Kausel et al., 1998,1999; Sarmiento et al., 2000; Lopez et al., 2001). La obtención y caracterización de un nuevo clon, λ GP4, que contiene la región promotora de una de las dos copias del gen Pit-1 se convierte en una necesaria e importante contribución para el diseño de estudios funcionales y esclarecimiento de los eventos moleculares involucrados en el proceso adaptativo que experimenta este pez. Además las secuencias génicas de las regiones promotoras de dos genes duplicados permiten estudios de la diploidización funcional del genoma de este vertebrado (Leipoldt, 1983).

Previamente, en nuestro laboratorio describimos las secuencias génicas correspondientes a regiones codificantes de la región carboxilo terminal de Pit-1 (gen-I) de carpa y la secuencia de la región codificante completa de otro gen de Pit-1 (gen-II) de carpa incluyendo 1.1 kb de región 5' flanqueante (Kausel et al., 1999). El presente trabajo tuvo como objetivo la obtención de secuencias regulatorias del gen-I de Pit-1 de carpa, lo cual se logró con el aislamiento del clon λ GP4 que contiene la secuencia completa de gen-I de Pit-1 de carpa. Sin embargo, el aislamiento de las secuencias implicó un extenso rastreo de la biblioteca genómica hasta lograr la purificación de los clones positivos, todo lo cual

ocupó una gran parte de tiempo en el desarrollo de esta tesis. Finalmente, se pudo revelar una secuencia de aproximadamente 0.8 kb perteneciente a la región promotora del gen-I y se consideró la determinación de elementos cis-regulatorios en esta secuencia. La comparación con secuencias de consenso en promotores de genes blanco de Pit-1, en carpa y otras especies, y en especial, la comparación de las regiones regulatorias de los dos genes Pit-1 de carpa que podría indicar una posible regulación diferencial de los genes duplicados en este teleósteo tetraploide.

En el promotor del gen-I de Pit-1 de carpa se observó una posible caja TATA separada 85 nt del ATG. El sitio de inicio de la transcripción se determinó 29 nucleótidos río abajo de la caja TATA coincidiendo con una G en esa posición. Se observó un solo tamaño de transcrito, lo que sugiere que no existen variantes de tamaño de mensajero de Pit-1 en la región río arriba del oligo utilizado. Esto concuerda con que en peces no se han observado variantes del “splicing” en el gen Pit-1 (Majumdar et al., 1996). En la mayoría de las secuencias promotoras de genes eucarióticos, transcritos por la RNA polimerasa II, la caja TATA se ubica alrededor de 25-30 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción y en su mayoría el inicio de la transcripción corresponde a una A (Turner et al., 1998). En las especies estudiadas se obtuvo una distancia muy similar entre la caja TATA y el ATG en promotores del gen de Pit-1, esta distancia es aproximadamente 50 nucleótidos. En carpa en ambas copias la distancia es aproximadamente 20 nucleótidos mayor (Fig.5). Esta diferencia podría involucrar mecanismos de regulación distintos al presentar la carpa mayor cantidad de secuencia disponible en esta región.

No existen estudios de la región promotora del gen de Pit-1 en otros peces. Nuestros resultados demostraron una importante similitud en carpa y en pez cebra, tanto en las secuencias de la región promotora como en el número y disposición de los sitios de unión.

El análisis de la secuencia del gen-I con TESS y MatInspector, reveló la presencia de posibles sitios de unión de varios factores de transcripción en la región promotora del gen. Con los resultados entregados por ambos programas y utilizando los sitios de mayor probabilidad de unión fue posible construir un esquema de los factores de transcripción que se unirían a la secuencia promotora del gen-I de Pit-1. Estos incluyen sitios para Pit-1, AP-1, CREB y MTF-1 (Fig. 8).

En la región promotora de ambos genes de Pit-1 de carpa se encontró un solo sitio de unión para CREB. Esto concuerda con los antecedentes reportados en ratón donde también se describe un solo sitio de unión para CREB (Pfäffle et al., 1992). Sin embargo, en la misma familia de roedores, diversos autores han descrito la existencia de dos sitios de unión para CREB (Chen et al., 1990; McCormick et al., 1991). El significado de estas diferencias no está claro aún ya que se ha visto que los sitios de unión para CREB en los promotores de rata y ratón regulan la expresión de la misma forma. Un incremento de los niveles de cAMP activa la transcripción de Pit-1 (McCormick et al., 1991). En contraste con los promotores de rata o ratón, el promotor de Pit-1 de humano no tiene sitios de unión para CREB dentro de su región promotora proximal o distal. Sin embargo, en la región promotora distal [-0.8 kb], presenta sitios de unión para AP-1 y Oct-1 que regulan negativamente su expresión (Delhase et al., 1996). En roedores y humanos se encontró en la región promotora proximal de Pit-1, dos sitios autorregulatorios (Chen et al., 1990; McCormick et al., 1991; Jong et al., 1994; Delhase et al., 1996; de la Hoya et al., 1998). Uno de ellos, localizado río abajo del sitio de inicio de la transcripción, tendría regulación negativa por Pit-1 (Chen et al., 1990). Este, no fue detectado en la secuencia obtenida en este trabajo, sugiriendo un sistema diferente de autorregulación. Kausel et al., (1999)

tampoco encontró este elemento cis en sus estudios sobre la secuencia del gen-II en la misma especie.

De acuerdo con Xu et al. (1998), secuencias consenso para la unión de Pit-1 y para factores específicos como AP-1 o CREB, podrían estar involucradas en la activación célula-específica del gen de Pit-1 durante el desarrollo y/o en la modulación de la expresión de Pit-1 por estímulos externos.

Se han descrito sitios de unión para Pit-1 en varias regiones reguladoras de genes expresados en pituitaria (Iguchi et al., 1999) que incluyen su propio gen (de la Hoya et al., 1998). El análisis realizado en esta tesis confirma la secuencia consenso de unión de Pit-1 informada por otros autores (Yamada et al., 1993; de la Hoya et al., 1998). Como se esperaba, el estudio muestra que no existen diferencias importantes en la secuencia consenso para la unión de Pit-1 en los promotores de las especies de peces estudiadas ni en los promotores de humano y peces (Fig. 10). Claramente las secuencias directamente flanqueantes son importantes, influyendo en la interacción del factor de transcripción Pit-1 (Scully et al., 2000). Además, el número, la ubicación y espaciamiento en la región promotora de secuencias de unión de factores interactuantes tiene influencia en la expresión célula-específica de los genes blanco (Weatherly et al., 2001). Así entonces, el promotor del gen de GH en mamíferos posee dos sitios de unión de Pit-1 bien conservados en la región promotora proximal (Scully et al., 2000), mientras que el promotor de prolactina posee un sitio de unión a Pit-1 en la región promotora proximal y tres sitios adicionales en los 3 Kb de secuencia 5' flanqueante (Scully et al., 2000). El factor Pit-1 activa la expresión del gen de hormona de crecimiento en un tipo celular, las somatotropas, y restringe la expresión en un segundo tipo celular, las lactotropas. La distinción depende de un espaciamiento de dos pares de bases para acomodar las regiones bipartitas del dominio

POU de Pit-1 en un sitio conservado en el promotor de hormona de crecimiento (Scully et al., 2000). El efecto alostérico en combinación con otros factores de unión al DNA resulta en el reclutamiento de un complejo co-represor en las células lactotropas (Scully et al., 2000).

Las secuencias flanqueantes de los sitios de unión son únicas y parecen importantes en la efectividad de la función del factor unido a la secuencia de consenso. Se ha mostrado una acción especie-específica de Pit-1 en experimentos de cotransfección de promotores de *Sparus auratus* donde la proteína homóloga de Pit-1 de rata no produjo significativo aumento en la actividad luciferasa en células CHO, HeLa y 293 humanas (Astola et al., 2003). No se observó lo mismo en promotor de somatolactina de salmón, donde, al ser cotransfectado en células HeLa con un plasmidio de expresión para Pit-1 de rata, este último demostró ser más eficiente que la proteína de salmón (Ono et al., 1994).

Recientemente, se ha reportado la identificación de un putativo sitio de unión para Pit-1 en la región promotora del gen que codifica para el receptor del péptido liberador de Prolactina Humano [PrRPR] (Ozawa et al., 2002), y se postula que puede estar contribuyendo a la regulación de los niveles de PrRPR en pituitaria anterior a través de la activación del gen de PrRPR en tumores hipofisarios (Ozawa et al., 2002). Además estos investigadores, mostraron que la coexpresión con Pit-1 lleva a un significativo incremento de la actividad del promotor de PrRPR (Ozawa et al., 2002) lo que contribuye a dilucidar el papel que juega Pit-1 en la regulación de la síntesis de prolactina. En la carpa observamos un aumento dramático de la expresión de PRL en peces de verano respecto a invierno y un concomitante aumento de la transcripción de Pit-1 que sugiere su participación en los eventos moleculares que regulan la variación de PRL en respuesta al estímulo ambiental (Kausel et al., 1999). Actualmente en nuestro laboratorio se están caracterizando péptidos

hipotalámicos y sus respectivos receptores en la pituitaria de carpa específicos para la activación de la expresión y secreción de prolactina (Montefusco et al., 2003, Romero et al., 2003). Claramente Pit-1, el factor de transcripción que se puede unir a regiones regulatorias de múltiples factores del eje hipotálamo-hipofisiario podría jugar un importante papel en la regulación de la red de interacciones moleculares en la pituitaria donde subyace la respuesta adaptativa a estímulos extrínsecos como la de variaciones circanales en el habitat natural.

El análisis de la secuencia del gen-I incluyó alineamiento con la región promotora del gen-II, el cual mostró diferencias en la mitad de la secuencia. Una zona especialmente diferente se encuentra ubicada entre el sitio de inicio de la transcripción y el codón ATG de ambos genes (en el gen II, nt. 1068-1090; en el gen I, nt. 684-717) y en el caso del gen I es 10 nucleótidos más extensa. Al ver esta diferencia se puede pensar en nucleótidos que se hayan introducido por error durante la reacción de PCR, pero una comparación de esta zona con la región 5' no traducida del cDNA, mostró un 100% de identidad, lo que indica que tanto el 5' cDNA como el clon pcGP4₇₇₆ corresponden a secuencias del gen-I. Un análisis de esta región con TESS muestra gran diferencia en los posibles sitios de unión de factores de transcripción. Llama la atención que en el gen I se identificó dos sitios con alta probabilidad de unión para el factor MTF-1, el primero río arriba del sitio de inicio de la transcripción, con orientación sentido y el otro río abajo del inicio de la transcripción, en orientación antisentido en la región única proximal de 33 nucleótidos del promotor del gen-I. Estos sitios no fueron reportados por Kausel et al (1999) en la región promotora del gen-II. Un análisis utilizando TESS en la región promotora del gen-II, realizado en esta tesis mostró que el gen-II solamente comparte con el gen-I el sitio MTF-1 río arriba del inicio de la transcripción.

MTF-1 es un factor de transcripción evolutivamente conservado que activa la transcripción de una familia de proteínas de bajo peso molecular inducidas por metales llamadas Metalotioneinas (MT) (Saydam et al., 2002). Por análisis de Northern blot se ha mostrado que MTF-1 se expresa en varios tejidos en ratón, incluyendo cerebro, donde se expresa en tempranas etapas del desarrollo (Chen et al., 2002). MTF-1 se une específicamente a elementos de respuesta a metales (MREs, de su sigla en inglés: metal-responsive elements), ubicadas en los promotores de MTs inducidas por metal y de otros genes involucrados en la homeostasis de metales y respuesta a stress celular de variados organismos incluyendo peces (Saydam et al., 2002). Esto sugiere que metales pesados por medio de MTF-1 podrían influir la expresión de Pit-1. Además se ha reportado en juveniles de salmón del Atlántico, que el 4-nonilfenol, un químico medio ambiental con efectos estrogénicos, indujo síntesis de mRNA de Pit-1 a una concentración de 125 mg por Kg de peso corporal (Yadatie and Male, 2002). Por lo tanto Pit-1 podría estar involucrado en la respuesta a contaminantes del medio ambiente acuático y un cambio de la expresión de Pit-1 podría indicar tempranamente un efecto al organismo.

Según estudios recientes por análisis de marcadores microsatelitales, el genoma de *C. carpio* se duplicó unos 15 millones de años atrás (Durand et al., 2002; Tsigenopoulos et al., 2002). La poliploidización es la duplicación completa del genoma en un organismo (Wolfe et al., 2003). La duplicación del material genético aumenta en una vez el número de genes y así las posibilidades del uso de esta información génica (Ohno, 1970). El número de cromosoma de carpa (100) es el doble del número en especies relacionados en el mismo clado (Durand et al., 2002). Genes de copia única en otros vertebrados, en la carpa pueden existir en dos copias y cuatro alelos (Ferris y Whitt, 1977; Leipoldt, 1983). En mamíferos se han reportado duplicaciones génicas segmentales en genes e incluso cromosomas (Bailey

et al., 2002). Sin embargo, la poliploidía conserva la necesaria relación estequiométrica entre productos génicos, mientras la duplicación de genes los pone en desbalance con sus compañeros interactuantes (Lynch et al., 2000). De acuerdo con lo esperado en un genoma duplicado se observaron dos cromosomas marcados con una sonda para un gen que tiene un locus en una especie diploide (Inafuku et al., 2000). Otro indicio es que para diversos genes conocidos clásicamente como genes de copia única, se han encontrado dos transcritos que sugieren dos genes diferentes en este pez, por ejemplo L41 (Vera et al., 2003). Claramente existen dos genes Pit-1 en *C. carpio*. No obstante, se utiliza en un momento solamente la mitad de la información génica y la carpa aparece funcionalmente diploidizada (Leipold, 1983). No se sabe el mecanismo de la regulación de la expresión de los genes duplicados en un organismo tetraploide. En principio existen tres posibilidades para la evolución de secuencias duplicadas: 1) un miembro del par duplicado se podría transformar en un pseudogen que no termina en un producto funcional; 2) podría tomar una nueva función; ó 3) los dos genes duplicados podrían dividirse las múltiples funciones del gen ancestral redefiniendo cada copia a un más estricto set de tareas (Lynch, 2002; Wolfe et al., 2003). El ultimo proceso de subfuncionalización se observa por ejemplo en los genes duplicados de *cyp19* en pez cebra, donde se expresan transcritos parecidos en distintos tejidos (Chang et al., 2001). En carpa se observó un cambio en la relación de la expresión de los dos genes POMC (Pro-opiomelanocortina) inducido por un cambio de temperatura (Arends et al., 1998).

A partir de las secuencias específicas de Pit-1 se demostró inequívocamente que las dos copias se expresan en una carpa aclimatizada a verano y que el mensajero del gen-II es aproximadamente 1,4 veces mas abundante que el del gen-I. Sin embargo, este resultado se estudiará en un número mayor de carpas aclimatizadas de cada estación. Además, ensayos

de hibridación *in situ* con sondas copia específicas podrían revelar una ubicación en células específicas de la glándula pituitaria que podría dilucidar una subfuncionalización relacionada con los distintos genes blancos de Pit-1.

En resumen, a través del trabajo realizado en esta tesis se logró aislar y caracterizar la región promotora proximal del gen-I Pit-1 y se destacaron las similitudes y las diferencias respecto al gen-II. Además, se ha mostrado que las dos copias del gen se expresan en un individuo aclimatizado a verano y que el mensajero del gen-II es más abundante que el del gen-I. No obstante, las secuencias reveladas de *Cyprinus carpio* permitirán el diseño de estudios funcionales para determinar la importancia de los sitios identificados y determinar la función *in vivo*.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, M., Kausel, G., Figueroa, J., Vera, M.I. (2001). Environmental reprogramming of protein kinase CK2 β subunit expression in fish. *Mol. Cell. Biochem.* 227, 107-112.
- Andersen, B., Rosenfeld, M. (1994). Pit-1 determines cell types during development of the anterior pituitary gland. *J. Biol. Chem.* 269, 29335-29338.
- Andersen, B., Rosenfeld, M. (2001). POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocr. Rev.* 22, 2-35.
- Arends, R.J., van der Gaag, R., Martens, G.J., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G. (1998). Differential expression of two pro-opiomelanocortin mRNAs during temperature stress in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Endocrinol.* 159, 85-91.
- Argenton, F., Ramoz, N., Charlet, N., Bernardini, S., Colombo, L., Bortolussi, M. (1996). Mechanisms of transcriptional activation of the promoter of the rainbow trout prolactin gene by GHR1/Pit-1 and glucocorticoid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 224, 57-66.
- Argenton, F., Vianello, S., Bernardini, S., Lopreiato, R., Colombo, L., Bortolussi, M. (2002). Trout GH promoter analysis reveals a modular pattern of regulation consistent with the diversification of GH gene control and function in vertebrates. *Mol. Cell. Endocrinol.* 189, 11-23.
- Astola, A., Ortiz, M., Caldusch-Giner, J.A., Perez-Sanchez, J., Valdivia, M.M. (2003). Isolation of *Sparus auratus* prolactin gene and activity of the cis-acting regulatory elements. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134, 57-61.

- Bailey, J., Gu, Z., Clark, R., Reinert, K., Samonte, R., Schuwartz, S., Adams, M., Myers, E., Li, P., Eichler, E., (2002). Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297, 1003-1007.
- Bodner, M., Castrillo, J.L., Theill, L.E., Deerinck, T., Ellisman, M., and Karin M. (1988). The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55, 505-518.
- Chen, R., Ingraham, H.A., Treacy, M.N., Albert, V.R., Wilson, L., Rosenfeld, M.G. (1990). Autoregulation of pit-1 gene expression mediated by two cis-active promoter elements. *Nature* 346, 583-586.
- Chiang, E.F., Yan, Y.L., Guiguen, Y., Postlethwait, J. Chung, B. (2001). Two cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Mol. Biol. Evol.* 18, 542-550.
- Chiou, C., Chen, H., Chang, W. (1990). The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1087, 91-94.
- Dasen, J.S., Rosenfeld, M.G. (2001). Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 327-55.
- David, L., Blum, S., Feldman, M.W., Lavi, U., Hillel, J. (2003). Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1425-1434.
- De la Hoya, M., Vial, V., Jiménez, O., Castrillo, J.L. (1998). Anterior pituitary development and Pit-1/GHF-1 transcription factor. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 1059-1066.

- Delhase, M., Vila, V., Hooghe-Peters, E.L., Castrillo, J.L. (1995). A novel pituitary transcription factor is produced by alternative splicing of the human GHF-1/Pit-1 gene. *Gene* 155, 273-275.
- Delhase, M., Castrillo, J.L., de la Hoya, M., Rajas, F., Hooghe-Peters, E.L. (1996). Ap-1 and Oct-1 transcription factors down-regulate the expression of the human Pit-1/GHF-1 gene. *J.Biol. Chem.* 271, 32349-32358.
- Durand, J., Tsigenopoulos, C., Ünlü, E., Berrebi, P., (2002). Phylogeny and biogeography of the family cyprinidae in the middle east inferred from Cytochrome *b* DNA- evolutionary significance of this region. *Mol. Phyl. Evol.* 22, 91-100.
- Evans, D.H. (1993). The Physiology of Fishes, ed. D.H. Evans, CRC Press, Boca Raton, pgs. 315-341.
- Falcon, J., Besseau, L., Fazzari, D., Attia, J., Gaildrat, P., Beauchaud, M., Boeuf, G. (2003). Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. *Endocrinology*, 2003 Jul 17 [Epub ahead of print].
- Ferris, S.D., Whitt, G.S. (1977). The evolution of duplicate gene expression in the carp (*Cyprinus carpio*). *Experientia* 33, 1299-1300.
- Figuroa, J., Molina, A., Alvarez, M., Villanueva, J., Reyes, A., Leon, G., Krauskopf, M. (1994). Prolactin gene expression and changes of prolactin pituitary level during the seasonal acclimatization of the carp. *Comp. Biochem. Physiol.* 108B, 551-560.
- Figuroa, J., Reyes, A., Rios, M., Vera, M.I., Krauskopf, M. (1997). Effect of temperature and photoperiod on prolactin transcription in *Cyprinus carpio*. *Zool. Sci.* 14, 353-357.
- Figuroa, J., Kausel, G., San Martin, R. (2000). Growth hormone expression in carp pituitary during acclimatization. *J. Physiol. London* 523P, 36S.

- Figueroa, J., Fernandez, K., Haussmann, D., Richards, G., Barra, V., Kausel, G. (2002). Glandular kallikreins in the teleost *Cyprinus carpio*: tissue distribution, possible involvement in prolactin processing, and effect of 17 beta-estradiol *in vivo*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 135-142.
- Figueroa, J., Morley, S., Gallardo, M.G., Richter, D. (2003). Pro-isotocin genes in the teleost *Catostomus commersoni*. (Paper en preparación).
- Figueroa, J., Romero, A., Flores, C., Soto, M., Haussmann, D., Kausel, G., Muller, M. (2003). Copeptin, el motivo C-terminal del precursor de la poliproteína isotocina, ejerce actividad liberadora de prolactina en explantes de pituitaria de *Cyprinus carpio*. *Biological Research* 36, R-94.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.-L., Postlethwait, J. (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151, 1531-1545.
- Garbutt, G.J., Wilson, J.T., Schuster, G.S., Leary, J.H., Ward, D.C. (1985). Use of biotinylated probes for detecting sickle cell anemia. *Clin. Chem.* 31, 1203-1206.
- Goldspink, G. (1995). Adaptation of fish to different environmental temperature by qualitative and quantitative changes in gene expression. *J. Therm. Biol.* 20, 167-174.
- Haugen, B.R., Wood, W.M., Gordon, D.F., Ridgway, E.C. (1993). A thyrotrope-specific variant of Pit-1 transactivates the thyrotropin beta promoter. *J. Biol Chem.* 268, 20818-24.
- Herr, W., Sturm, R.A., Clerc, R.G., Corcoran, L.M., Baltimore, D., Sharp, P.A., Ingraham, H.A., Rosenfeld, M.G., Finney, M., Ruvkun, G., Horwitz, H.R. (1988). The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2 and *Caenorhabditis elegans* unc86 gene products. *Genes Develop.* 2, 1513-1516.

- Iguchi G, Okimura Y, Takahashi T, Mizuno I, Fumoto M, Takahashi Y, Kaji H, Abe H, Chihara K. (1999). Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *J Biol Chem.* 274, 12108-14.
- Inafuku, J., Nabeyama, M., Kikuma, Y., Sayito, J., Kubota, S., Kohno, S. (2000). Chromosomal location and nucleotide sequences of 5S ribosomal DNA of two cyprinid species (Osteichthyes, Pisces). *Chromosome Research* 8, 193-199.
- Ingraham, H.A., Chen, R., Mangalam, H.J., Elsholtz, H.P., Flynn, S.E., Lin, C.R., Simmons, D.M., Swanson, L., and Rosenfeld, M.G. (1988). A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55, 519-529.
- Ingraham, H.A., Flynn, S.E., Voss, J.W., Albert, V.R., Kapiloff, M.S., Wilson, L., and Rosenfeld, M.G. (1990). The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1-Pit-1 interactions. *Cell* 61, 1021-1033.
- Jacobson, E.M., Li, P., Leon-delRio, A., Rosenfeld, M.G., Aggarwal, A.K. (1997). Structure of Pit-1 POU domain bound to DNA as a dimer: unexpected arrangement and flexibility. *Genes and Dev.* 11, 198-212.
- Jaenisch, R. Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics Supplement* 33, 245-254.

- Kausel, G., Vera, M.I., Figueroa, J., Hernandez, J., San Martin, R., Molina, A., Chavez, V.M., Muller, M., Martial, J., Krauskopf, M. (1998). Effect of seasonal acclimatization on the expression of the carp transcription factor Pit-1. *Biochem. Mol. Biol. Internat.* 45, 813-821.
- Kausel, G., Vera, M.I., San Martin, R., Figueroa, J., Molina, A., Muller, M., Martial, J., Krauskopf, M. (1999). Transcription factor Pit-1 expression is modulated upon seasonal acclimatization of eurythermal ectotherms: identification of two Pit-1 genes in the carp. *J. Cell. Biochem.* 75, 598-609.
- Krauskopf, M., Amthauer, R., Araya, A., Concha, M., Leon, G., Rios, L., Vera, M.I., Villanueva, J. (1988). Temperature acclimatization of the carp. Cellular and molecular aspects of the compensatory response. *ARch. Biol. Med. Exp.* 21, 151-157.
- Kurima, K., Weatherly, K., Sharova, L., Wong, E. (1998). Synthesis of turkey Pit-1 mRNA variants by alternative splicing and Transcription initiation. *Dna and Cell Biol.* 17, 93-103.
- Leipoldt, M. (1983). Towards an understanding of the molecular mechanisms regulating gene expression during diploidization in phylogenetically polyploid lower vertebrates. *Human. Genet.* 65, 11-18.
- Lewin, B. (2001). Genes VII. Oxford University Press and Cell Press, Great Claderon Street, Oxford, OX2 6DP.
- Li, S., Crenshaw III, E.B., Rawson, E.J., Simmons, D.M., Swanson, L.W., and Rosenfeld, M.G. (1990). Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene Pit-1. *Nature* 347, 528-533.

- Lipkin, S.M., Näär, A.M., Kalla, K.A., Sack, R.A., Rosenfeld, M.G. (1993). Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1 dependent growth hormone gene expression. *Genes and Dev.* 7, 1674-1687.
- Lorens, J.B., Aasland, R., Brunstad, H., Bergh, H., Male, R. (1996). Two variants of the pituitary specific transcription factor Pit-1 in Atlantic Salmon. *J. Mol. Endocrinol.* 17, 225-236.
- Lopez, M., Figueroa, J., Kausel, G., Vera, M.I., Krauskopf, M. (2001). *In situ* hybridization of somatolactin transcripts in the pituitary glands from acclimatized carp (*Cyprinus carpio*). *Biol. Res.* 34, 7-13.
- Lynch, M. (2002). Gene duplication and evolution. *Science* 297, 945-947.
- Lynch, M., Conery, J. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290, 1151-1155.
- Majumdar, S., Irwin, D.M., Elsholtz, H.P. (1996). Selective constraints on the activation domain of transcription factor Pit-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10256-10261.
- MacCormick, A., Brady, H., Theill, L.E., Karin, M. (1990). Regulation of the pituitary-specific homeobox gene GHRF1 by cell-autonomous and environmental cues. *Nature* 345, 829-832.
- Molina, A., Corta, A., San Martin, R. Alvarez, M., Burzio, L.O., Krauskopf, M., Vera, M.I. (2002). Gene structure of the carp fish ribosomal protein L41: seasonally regulated expression. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 295, 582-586.
- Montefusco, R., Romero, A. y Figueroa, J. (2003). Neuropeptido hipotalámico liberados de prolactina con motivo RF-AMIDA (Rfa): identificación y localización en peces. *Biological Research* 36, R-79.

- Morris, A.E., Kloss, B., McChesney, R.E., Bancroft, C., and Chasin, L.A. (1992). An alternatively spliced Pit-1 isoform altered in its ability to trans-activate. *Nucleic Acids Res.* 20, 1355-1361.
- Mount, D. W., Bioinformatics, sequence and genome analysis. Gold Spring Harbor Laboratory 2001, New York.
- Muller, M., Kausel, G., Toro, S., Close, R., Martial, J.A. (2002). Anterior pituitary in fish. 10th Meeting of the European Neuroendocrine Association (ENEA), 12.-14. September 2002, Munich, Germany, PA-37, p.63.
- Nelson, J.S. (1994). Fishes of the World. 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Ohkubo, T., Araki, M., Tanaka, M., Sudo, S., Nakashima K. (1996). Molecular cloning and characterization of the yellowtail GH gene and its promoter: a consensus sequence of teleost and avian Pit-1/GHF-1 binding sites. *J. Mol. Endocrinol.* 16, 63-72.
- Ohno, S. (1970). Evolution by gene duplication. Springer-Verlag, New York.
- Ono, M., Takayama, Y. (1992). Structures of cDNAs encoding chum salmon pituitary specific transcription factor, Pit-1/GHF-1. *Gene* 226, 275-279.
- Ono, M., Harigai, T., Kaneko, T., Sato, Y., Ihara, S., Kawauchi, H. (1994). Pit-1/GHF-1 factor involvement in the gene expression of somatolactin. *Mol. Endocrinol.* 8, 109-115.
- Peers, B., Monget, Po., Nalda, M.A., Voz, M.L., Berwaer, M., Belayew, A., Martial, J.A. (1991). Transcriptional induction of the human prolactin gene by cAMP requires two cis-acting elements and at least the pituitary specific factor Pit-1. *J. Biol. Chem.* 266, 18127-18134.

- Poncelet, A.C., Yaron, Z., Levavi-Sivan, B., Martial, J.A., and Muller, M. (1996). Regulation of prolactin gene expression in fishes. "Recent advances in marine biotechnology." Nagabhushanan, R., Thompson, M.-F., and Fingerman, M. (eds.), Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, pp.383-405.
- Prosser, C. L. (1986). *Adaptational biology: molecules to organisms*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Rand-Weaver, M., Kawauchi, H. (1993). Growth hormone, prolactin and somatolactin: a structural overview. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol.2, Hochachka and Mommsen (eds.), 39-56.
- Salazar, M., Kausel, G., Castro, L., Figueroa, J. Expresión diferencial de los genes de Pit-1 del genoma duplicado de *Cyprinus carpio*. *Biological Research* 36, R-137.
- San Martin, R, Caceres, P., Azócar, R., Alvarez, M., Molina, A., Vera, M.I., Krauskopf, M. (2003). Seasonal environmental changes modulate the prolactin receptor expression in an eurythermal fish. *J. Cell. Biochem.*, in press.
- Sarmiento, J., Leal, S., Quezada, C., Kausel, G., Figueroa, J., Vera, I.M., Krauskopf, M. (2001). Environmental acclimatization of the carp modulates the transcription of beta-actin. *J. Cell. Biochem.* 80, 223-228.
- Sekkali, B., Belayew, A., Bortolussi, M., Martial, J.A., Muller, M. (1999). Pit-1 mediates cell-specific and cAMP-induced transcription of the tilapia GH gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 152, 111-23.
- TESS: Transcription Element Search Software on the WWW' (1997), Jonathan Schug and G. Christian Overton, Technical Report CBIL-TR-1997-1001-v0.0, Computational Biology and Informatics Laboratory, School of Medicine, University of Pennsylvania,

- Tsigenopoulos, C., Ráb, P., Naram, D., Berrebi, P. (2002). Multiple origins of polyploidy in the phylogeny of southern african barbs (cyprinidae) as inferred from mtDNA markers. *Heredity*. 88, 466-473.
- Tuggle, C.K., Trenkle, A. (1996). Control of growth hormone synthesis. *Domestic Animal Endocrin*. 13, 1-33.
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H. (1998). Instant Notes in Molecular Biology. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Vera, M.I., Kausel, G., Barrera, R., Leal, S., Figueroa, J., Quezada, C. (2000). Seasonal adaptation modulates the expression of the protein kinase CK2 beta subunit gene in the carp. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 271, 735-40.
- Vera, M.I., Molina, A., Pinto, R., Reyes, M., Alvarez, M., Krauskopf, E., Quezada, C., Torres, J., Krauskopf, M. (2003) Genomic organization of the rDNA cistron of the teleost fish *Cyprinus carpio*. *Biol Res*. 36, 241-51.
- Weatherly, K.L., Ramesh, R., Strange, H., Waite, K.L., Storrie, B., Proudman, J.A., Wong, E.A. (2001). The turkey transcripton factor Pit-1/GHF-1 can activate the turkey prolactin and growth hormone gene promoters in vitro but is not detectable in lactotrophs *in vivo*. *Gen. Comp. Endocrinol*. 123, 244-253.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1993). Endocrinology. The physiology of fishes. (ed. D.H. Evans) C.R.C. Press, Boca Raton, pp 469-502.
- Wolfe, K., Li, W-H., (2003). Molecular evolution meets the genomics revolution. *Nature Genetics Supplement* 33, 255-265.
- Yamada, S., Hata, J., Yamashita S. (1993). Molecular cloning of fish Pit-1 cDNA and its functional binding to promoter of gene expressed in the pituitary. *J. Biol. Chem*. 268, 24361-6.