



Universidad Austral de Chile  
Facultad de Ciencias

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

**CARACTERIZACIÓN DE SITIOS DE UNION PARA FACTORES DE  
TRANSCRIPCIÓN EN REGIONES REGULATORIAS DE LOS GENES  
DUPLICADOS PIT-1 DE *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**

**Leonardo Antonio Castro Avendaño**  
**Valdivia – Chile**  
**2007**

Dedicada a mi abuelo Ernesto Avendaño Aldunate.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi profesora patrocinante la Dra. Gudrun Kausel por su incondicional apoyo, paciencia, consejos y motivación en mi desarrollo en el sendero de la ciencia. Al Dr. Jaime Figueroa por permitirme trabajar en su laboratorio, por su contribución a la parte experimental y su disposición. Al Dr. Alejandro Reyes por aceptar ser mi profesor informante. A mi madre Sara y mis abuelos Ernesto e Hilda por su apoyo en todos estos años, sus consejos, su constante preocupación y estímulo. A mi esposa Thamara quien me ha dado su apoyo incondicional para concluir este proceso, por su amor, por su comprensión, paciencia y por su ejemplo. A mi hija Catalina Isidora quien sin saberlo, le ha dado luz a mi vida y un sentido más profundo. A la Cala y el Gringo por su cooperación. También quiero agradecer a mis amigos Enrique y Daniel, por su ejemplo, consejos y por su apoyo en las buenas y en las malas. A mis amigos Horst y Carlos por tantos momentos compartidos en esta etapa y su “palmada” en la espalda para decir “vamos”. A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Ariel y Tamara por su ayuda y por el tiempo compartido.

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** a través del proyecto **DID-UACH S-2004-57, Proyecto ACGI/CGRI-DRI 10/01068-3.4.**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>EPÍLOGO</b>	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b>	iv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	vi
<b>ABREVIATURAS</b>	viii
<b>1. RESUMEN</b>	1
1.1 SUMMARY	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	15
3.1 MATERIAL	15
3.1.1 Reactivos	15
3.1.2 Enzimas	15
3.1.3 Animales de experimentación	16
3.2 MÉTODOS	16
3.2.1 Preparación de sitios para unión de factores nucleares	16
3.2.2 Determinación de la eficiencia del marcaje con <sup>32</sup> P	17
3.2.3 Preparación de extracto nuclear de hipófisis de carpa	18
3.2.4 Reacción de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)	18
3.2.5 Conjugación de oligopéptido Pit1 de carpa a hemocianina	19
3.2.6 Inmunocitoquímica	19
3.2.7 Preparación de cromosomas metafásicos de <i>Cyprinus carpio</i>	20

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	23
4.1	Cien cromosomas constituyen el complemento tetraploide de <i>Cyprinus carpio</i>	23
4.2	Los promotores de los dos genes Pit1 han divergido significativamente desde la duplicación	25
4.3	Sitios de consenso unen factores nucleares específicos de pituitaria de carpa	34
4.4	Diseño y preparación de anticuerpo anti-Pit1 de carpa	44
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	50
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIG.1:</b> Esquema del control temporal del desarrollo de las líneas celulares de la glándula pituitaria	6
<b>FIG.2:</b> Interacción de Pit1 en el promotor de PRL	8-9
<b>FIG.3:</b> Relación filogenética y ploidia en la familia de los <i>Cyprinidae</i>	13
<b>FIG.4:</b> Cromosomas metafásicos de <i>Cyprinus carpio</i>	24
<b>FIG.5:</b> Arquitectura del promotor de los genes duplicados de Pit1 de carpa	26-27
<b>FIG.6:</b> Matrix dot blot del alineamiento de las secuencias promotoras de los dos genes Pit1	28
<b>FIG.7:</b> Posibles sitios de unión de los dos genes Pit1 de carpa	29-30
<b>FIG.8:</b> Alineamiento de la región cis-regulatoria del factor de transcripción Pit1 en <i>Cyprinidae</i>	33
<b>FIG.9:</b> Secuencias cis-regulatorias de los dos genes Pit1 de carpa	35
<b>FIG.10:</b> Análisis de los posibles sitios de unión del factor de transcripción Pit1 en la región cis-regulatoria del gen-I y gen-II de carpa por EMSA	38-39
<b>FIG.11:</b> Análisis del sitio ccP3 con factores de la glándula pituitaria de carpa por EMSA	40
<b>FIG.12:</b> Análisis del sitio ccC1 con factores de la glándula pituitaria de carpa por EMSA	41
<b>FIG.13:</b> Análisis de los posibles sitios de unión del factor MTF-1 específico en el gen-I	42
<b>FIG.14:</b> Esquema de elementos cis-regulatorios en los genes I y II de Pit1 de carpa	43
<b>FIG.15:</b> Alineamiento de secuencias aminoacídicas derivadas de Pit1	46-47
<b>FIG.16:</b> Diseño y preparación de un anticuerpo anti-Pit de carpa	48

**FIG.17:** Inmunodetección de Pit1 en cortes de hipófisis de carpa

50

**ABREVIATURAS**

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetracético
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>EMSA</b>	Electrophoretic Mobility Shift Assay
<b>PNK</b>	Polinucleótido quinasa

## 1. RESUMEN

En el teleósteo *Cyprinus carpio* el eje hipotálamo-hipofisiario juega un rol importante en la organización de la respuesta compensatoria para permitir la adaptación reversible a cambios de su medio ambiente. El factor de transcripción Pit1, específico de pituitaria, regula la expresión de los genes de hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL), subunidad  $\beta$  de la hormona estimulante de la tiroides ( $\beta$ -TSH), somatolactina (SL) y su propio gen. Los cambios modulares de elementos cis-regulatorios en los genes duplicados de Pit-1 reflejan la dinámica de secuencias regulatorias en este teleósteo, cuyo genoma se duplicó unos 15 millones de años atrás. Análisis *in vitro* revelaron la interacción específica de factores nucleares a secuencias de consenso conservadas en los genes I y II y sitios exclusivos en el gen-I, que podrían estar implicados en la regulación de la expresión diferencial en carpas aclimatizadas a invierno, las que muestran un mayor nivel de transcritos del gen-I. Así, el sitio ccP3 de unión al factor Pit1 y el sitio ccC1 de unión al factor CREB, mostraron interacción específica con factores nucleares en ambos genes Pit1, mientras que los sitios ccP5 y ccP6 de unión al factor Pit1 mostraron unión sólo en el gen-I. Por otra parte, los sitios ccM1 y ccM2, correspondientes a elementos de respuesta a metales (MRE), también mostraron unión a factores nucleares. El sitio ccM2 interaccionó específicamente con un factor nuclear en ambos genes, mientras que el sitio ccM1 mostró unión exclusivamente en el gen-I de Pit1. Este elemento MRE no había sido descrito antes en peces.

Otro acercamiento se obtuvo con un anticuerpo policlonal anti-cPit1 que inmunorreaccionó en núcleos de cortes sagitales de pituitaria de carpa.

Futuros estudios *in vivo* deberían considerar este anticuerpo para comprender la dinámica de nuevos módulos regulatorios en los genes duplicados de Pit1 de carpa.

## 1.1 SUMMARY

In the teleost *Cyprinus carpio* the hypothalamus-hypophysis axis plays an important role in organizing the compensatory response to allow the reversible adaptation to changes in the environment. The pituitary specific transcription factor Pit1, regulates the expression of growth hormone, prolactin,  $\beta$ -thyroid stimulating hormone, somatolactin genes and Pit1 itself. Modular changes of cis-regulatory elements in the Pit1 duplicated genes reflect the dynamics of regulatory sequences in this teleost which duplicated its genome about 15 MYA. *In vitro* analyses revealed the specific interaction of nuclear factors to conserved consensus sequences in the gene-I and gene-II, and exclusive sites in gene-I, that might be involved in the regulation of differential expression in winter acclimatized carp, which showed a higher level of transcripts from gene-I. Thus, the Pit1 binding site ccP3 and the CREB binding site ccC1, showed specific interaction with nuclear factors in both Pit1 genes, while the Pit1 binding sites ccP5 and ccP6 showed binding only in gene-I. On the other hand, the ccM1 and ccM2 sites, corresponding to metal responsive elements (MRE), showed binding to nuclear factors as well. The ccM2 site interacted specifically with a nuclear factor in both genes, while the ccM1 site showed binding exclusively in Pit1 gene-I. This MRE had not been described before in fishes.

Another approach was pursued with a polyclonal antibody, anti-cPit1, which immunoreacted in nuclei of sagittal slides of carp pituitary.

For future *in vivo* studies this antibody might be useful to reveal the dynamic of new regulatory modules in the carp Pit1 duplicated genes.

## 2. INTRODUCCIÓN

Dentro de los seres vivos, los peces euritermales han desarrollado respuestas compensatorias para sobrellevar los cambios ambientales circunuales que ocurren naturalmente en su hábitat (Alvarez *et al.*, 2004). Se distingue el proceso de adaptación en la situación natural, la aclimatización, de la situación en condiciones controladas del laboratorio, la aclimatación (Proser *et al.*, 1986). La carpa mostró en ambos procesos la modulación de la expresión génica a nivel transcripcional y traduccional en varios tejidos (Saez *et al.*, 1982; Vera *et al.*, 1993; Goldspink *et al.*, 1995; Figueroa *et al.*, 1994, 1997; Cossins *et al.*, 2005). En especial, los cambios significativos en la expresión de factores del eje hipotálamo-hipofisiario sugieren un rol importante de estos factores en la regulación de la adaptación a los cambios del medio ambiente (Kausel *et al.*, 1999). Principalmente la temperatura y el fotoperíodo constituyen los factores físicos que marcan este proceso de ajuste adaptativo, que refleja cambios de la expresión génica para proveer las condiciones homeostáticas que necesita el pez para sobrevivir (Figueroa *et al.*, 1999; Vera *et al.*, 2000; Buckley *et al.*, 2001). Sin embargo, la disponibilidad de alimento, o exposición a otros factores y xenobióticos, también pueden influenciar el proceso de adaptación y por tal la expresión génica (Alvarez *et al.*, 2004; Moens *et al.*, 2006).

La glándula pituitaria o hipófisis, está formada por dos partes que tienen distinto origen embrionario y diferente función, una parte posterior o neurohipófisis y una parte anterior o adenohipófisis (Bolander, 2004). La neurohipofisis tiene su origen en el tercer ventrículo y permanece conectada a la base del ventrículo por el infundíbulo. Por otra parte, la pituitaria anterior o adenohipófisis, se forma de una invaginación ectodermal o bolsa de Rathke. La neurohipófisis secreta en mamíferos vasopresina y oxitocina, en peces arginina-vasotocina e

isotocina. Estos péptidos son sintetizados en las neuronas peptidérgicas de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, empaquetadas en vesículas, transportadas por axones a la neurohipófisis y almacenadas hasta su liberación (Bolander, 2004; Flores *et al.*, 2007).

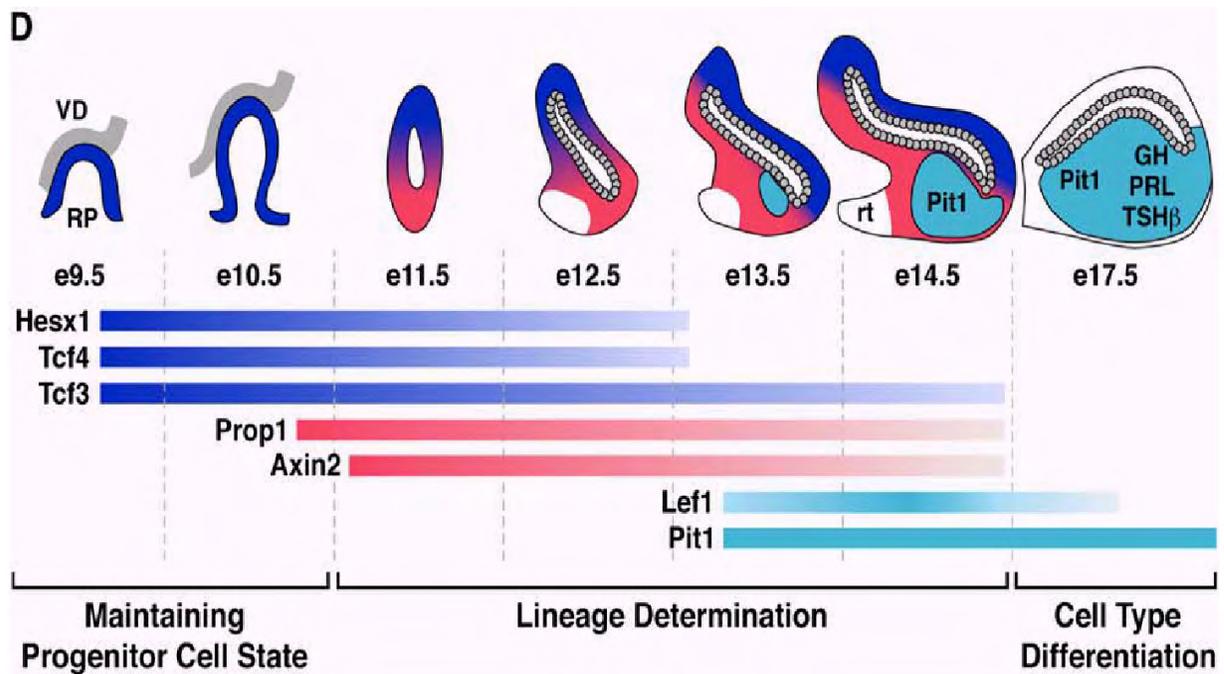
La adenohipófisis está compuesta de diferentes tipos celulares, las células somatotropas que secretan hormona del crecimiento (GH), las células lactotropas que secretan hormona prolactina (PRL) y las células que secretan hormonas tróficas, es decir, hormonas que regulan otra glándula (Bolander, 2004). Dentro de este grupo se encuentran las células tirotropas que secretan hormona estimulante de la tiroides (TSH), las células gonadotropas que secretan hormonas luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) y finalmente las células cortico-lipotróficas que secretan hormona adenocorticotrofina (ACTH) y péptidos relacionados. La secreción de estas hormonas está regulada por hormonas sintetizadas en el hipotálamo. En mamíferos, estas hormonas del hipotálamo llegan a la eminencia media y son transportadas a través del sistema portal hasta la adenohipófisis (Bolander, 2004).

El sistema y funcionamiento del eje hipotalamo-hipofisiario es parecido en vertebrae, en teleósteos se destacan algunos aspectos morfo-funcionales específicos (Norris, 1997). Los distintos tipos celulares que componen la adenohipófisis están agrupados de acuerdo a su función en tres regiones definidas dentro de la pituitaria anterior, las lactotropas en la región *rostral pars distalis* (RPD), las somatotropas en la región *proximal pars distalis* (PPD), y las células que sintetizan somatolactina (SL), una hormona relacionada con PRL y GH específica de peces, en la región *pars intermedia* (PI) (Evans *et al.*, 1993; Norris, 1997). Además, en teleósteos no existe una eminencia media y no hay un sistema portal, y los factores hipotalámicos que

controlan la liberación de las hormonas producidas en la adenohipófisis llegan directamente por axones y terminaciones axonales que conectan ambas estructuras (Norris, 1997).

El desarrollo y funcionamiento de las líneas celulares que producen PRL, GH y TSH subunidad  $\beta$  necesitan el factor de transcripción específico de la glándula pituitaria, Pit1 (Fig.1, Olson *et al.*, 2006). En teleósteos, además se necesita Pit1 para las células que producen SL (Andersen y Rosenfeld., 1994; Ono *et al.*, 1994; Poncelet *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 2006). Esto ha sido mostrado por mutaciones ocurridas naturalmente en el gen Pit1 detectadas en ratones enanos con un síndrome de hipoplasia de la glándula pituitaria e hipotiroidismo (Quentien *et al.*, 2006). El ratón enano Snell tiene una mutación puntual en la tercera hélice de la región POUhomeo, W261C (Lin *et al.*, 1994), el ratón enano Jackson una mutación nula del gen del factor de transcripción Pit1, es decir le falta la región del gen Pit1 en el genoma (Cohen *et al.*, 1996; Quentien *et al.*, 2006). En humanos, al menos 16 distintas mutaciones autosómicas recesivas o dominantes en Pit1 mostraron ser responsables de las deficiencias de estas hormonas causando síndromes de Deficiencia de Hormona Pituitaria Combinada (*combined pituitary hormone deficiency* CPHD) (Radovick *et al.*, 1992; Pellegrini *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2003). Además, análisis de mutaciones *in vitro* introducidos en el gen Pit1 y transfectadas en células han revelado la importancia de Pit1 en los mecanismos moleculares responsables de CPHD (Pfaffle *et al.*, 1996; Pernasetti *et al.*, 1998; Fofanova *et al.*, 1998; Salemi *et al.*, 2003). Por otra parte, los mutantes *pit1* en zebrafish carecen de tres tipos de células de pituitaria, lactotropas, somatotropas y tirotopas y muestran enanismo severo (Nica *et al.*, 2004).

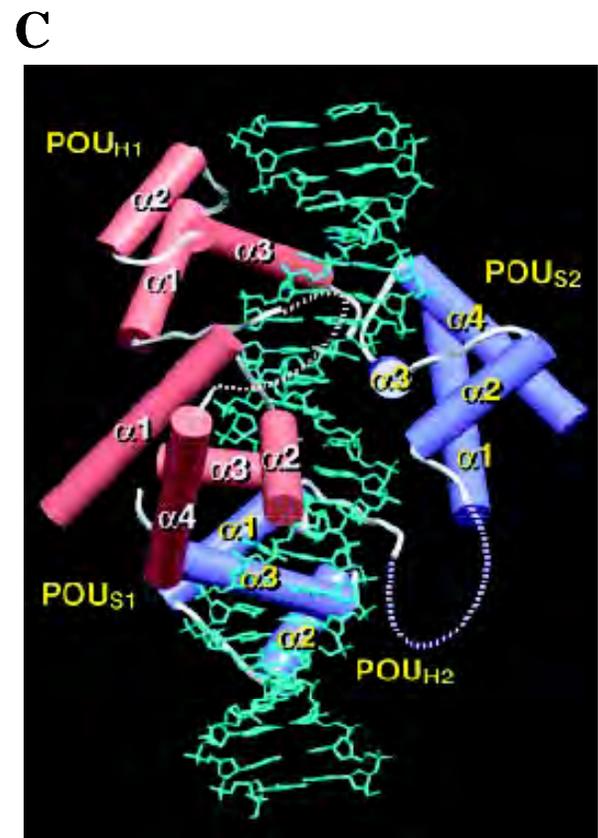
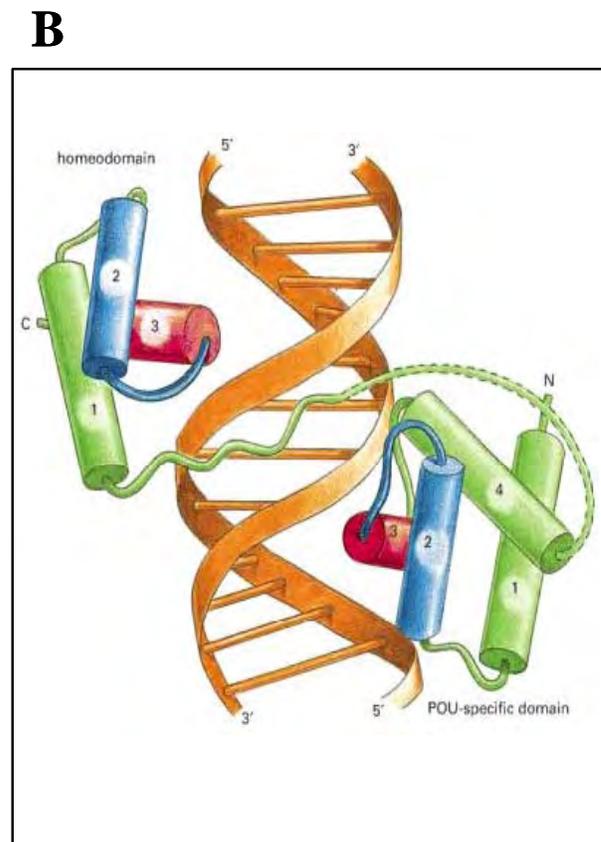
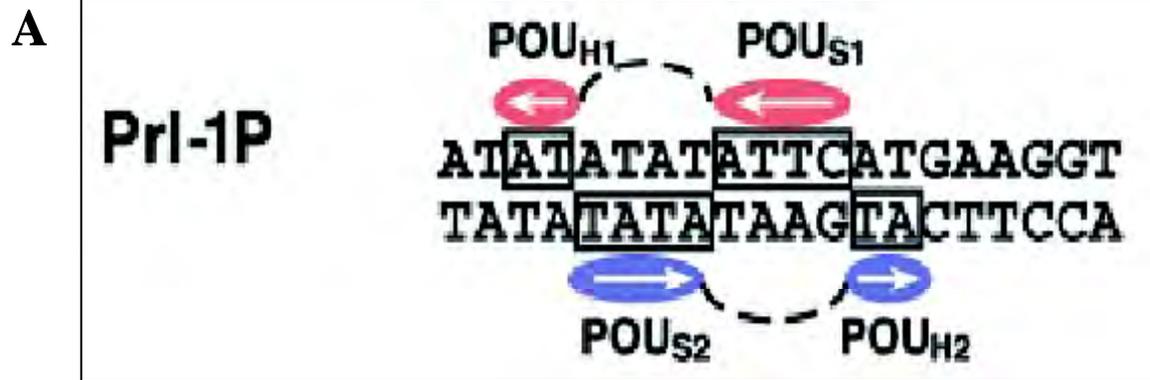
Pit1 es una proteína compuesta de dos dominios funcionales, el dominio transactivador N-terminal rico en residuos serina y treonina, y el dominio C-terminal donde está localizado el altamente conservado dominio POU de unión al DNA (Scully *et al.*, 1999). La familia de factores



**Fig.1: Esquema del control temporal del desarrollo de las líneas celulares de la glándula pituitaria.** En el esquema se destaca la expresión coordinada de factores con homeodominio críticos para el desarrollo de la pituitaria en mamíferos. Los tipos celulares del linaje Pit1 (celeste) expresan hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL) y hormona tiroideo estimulante subunidad beta (TSH-beta). Diencefalo ventral (VD), bolsa de Rathke (Rathke's pouch, RP), punto rostral (rostral tip, rt). Extraído de Olson et al., 2006.

con dominio **POU** se denominó según lo encontrado en factores de transcripción específico, el **Pit1**, en los factores **Oct** y en un factor de transcripción **Unc 84** importante en el desarrollo temprano de *Caenorhabditis elegans* (Ingraham *et al.*, 1990). El dominio POU se compone de dos subdominios, cada uno con un dominio homeobox con el motivo hélice-giro-hélice (HTH) para la unión al DNA. El homeobox es una secuencia de 180 nucleótidos que codifica un dominio de 60 aminoácidos altamente conservado que forma tres hélices alfa, la hélice 3 es la hélice de reconocimiento que se une al surco mayor estabilizado por la hélice 2 (HTH) y la hélice 1 (Scully *et al.*, 1999). El dominio homeobox se encontró primero en proteínas procarióticas que se unen al DNA, en el represor lac y represor lambda, y la estructura primaria es altamente conservada. Este motivo está presente en los productos de los genes homeóticos *antennapedia*, *fushi tarazu* y *ultrabitorax* de drosófila en un segmento de 60 aminoácidos, el homeobox. En el dominio bipartido POU se ubica hacia el amino termino el subdominio POU específico (POUs), un dominio de 69 a 78 amino ácidos altamente conservado, atado por un conector de 14 a 25 aminoácidos menos conservados, a un subdominio POU homeo (POUh) de 60 aminoácidos. La flexibilidad del conector, en particular, permite la posibilidad de diferentes espaciamientos y orientaciones relativas entre los subdominios (Fig.2, Scully *et al.*, 1999). Esto ayuda a expandir el repertorio de sitios de DNA reconocidos por las proteínas de dominio POU y tiene importantes implicaciones para entender los mecanismos de control de la expresión de genes en eucariontes (Scully *et al.*, 1999; Rosenfeld *et al.*, 2006).

Los factores de transcripción con dominio POU tienen gran habilidad para unirse al DNA tanto como monómeros o dímeros y, además, pueden adoptar diversas configuraciones en unión al DNA (Fig.2) (Wegner *et al.*, 1993; Herr y Cleary, 1995; Jacobson *et al.*, 1996; Scully *et al.*, 1999). Pit1 se une como dímero en las regiones promotoras de sus genes blancos y se autorregula



**Fig.2: Interacción de Pit1 en el promotor de PRL.** (A) Esquema de la unión de Pit1 como dímero en el sitio PRL-1P en el promotor del gen de PRL de ratón. (B) Representación de la unión de Pit1 al DNA como monómero. (C) Esquema estructural de (A). Verde: DNA de la región promotora del gen prolactina; región POU de la proteína Pit11: rojo; Pit12: azul. POUH: dominio POU-homeo; POU: dominio POU-especifico. (A) y (C) extraído de Scully et al., 1999, (B) extraído de Lodish, 2000.

ya que se une a su propio gen (Ingraham *et al.*, 1990). Parte de la versatilidad del factor Pit1 en regular la transcripción de varios genes blancos deriva de su inusual estructura bipartida contenida en el dominio POU de unión al DNA. El dominio POU<sub>s</sub> siempre se encuentra en conexión con el dominio POU<sub>h</sub> y es responsable de la alta afinidad y unión secuencia específica (Ingraham *et al.*, 1990). La estructura cristalográfica mostró que en el complejo Oct1-POU/DNA el dominio POU del Oct1 está unido como monómero en el octámero reconocido como sitio de unión, y que el dominio POU<sub>s</sub> y POU<sub>h</sub> interactúan en lados opuestos de la hélice del DNA (Klemm *et al.*, 1994). En el complejo cristalográfico del dominio POU de Pit1 con un sitio sintético de unión, una doble hebra 28-mer, el dominio POU de Pit1 se une como dímero, y los dominios POU<sub>h</sub> y POU<sub>s</sub> de una molécula se unen en surcos mayor adjacencias (Jacobsen *et al.*, 1997). La otra molécula se une en el lado opuesto y se forma una interfase del dímero entre el dominio POU<sub>h</sub> de un monómero con el dominio POU<sub>s</sub> del otro monómero unido en forma simétrica. La mutación R271W que causa el síndrome CPHD en humano se ubica exactamente en esta interfase del dímero (Radovick *et al.*, 1992).

Pit1 se une a un complejo patrón de sitios de unión dentro de los promotores y aumentadores de los genes que este regula. Las secuencias de estos sitios varían ampliamente alrededor de una secuencia de consenso poco conservada (A/T) (A/T) TATNCAT con la posibilidad de que Pit1 podría estar configurado diferentemente en los distintos sitios (Ingraham *et al.*, 1990; Holloway *et al.*, 1995). Sin embargo, las diferencias en la cantidad de desoxirribonucleótidos de las secuencias de reconocimiento de Pit1 en los promotores de los genes blanco que son activados por el factor de transcripción Pit1 en un tipo celular determinado de pituitaria, pueden tener un efecto de represión en la expresión de los genes de las mismas hormonas hipofisarias en otro tipo celular, permitiendo la activación o restricción de gen

recíproca durante la diferenciación de una línea celular común en la organogénesis de mamíferos (Scully *et al.*, 2000). El factor de transcripción Pit1 se une a su secuencia de reconocimiento en el promotor de PRL con un espaciamiento de 4pb entre el dominio POU<sub>s</sub> y el dominio POU<sub>h</sub>, pero con un espaciamiento de 6pb, dos pares TT adicionales, en su secuencia de reconocimiento en el gen de GH. Esta diferencia produce una represión de la transcripción del gen de GH en fibroblastos de rata (Scully *et al.*, 2000).

Por lo tanto Pit1 puede interactuar como monómero o dímero, formar y reclutar complejos con otras proteínas que interactúan con el DNA y/o proteínas corepresoras/coactivadoras y así integrar señales y participar en el control de la respuesta transcripcional en complejos que reprimen o activan la transcripción génica (Rosenfeld *et al.*, 2006)

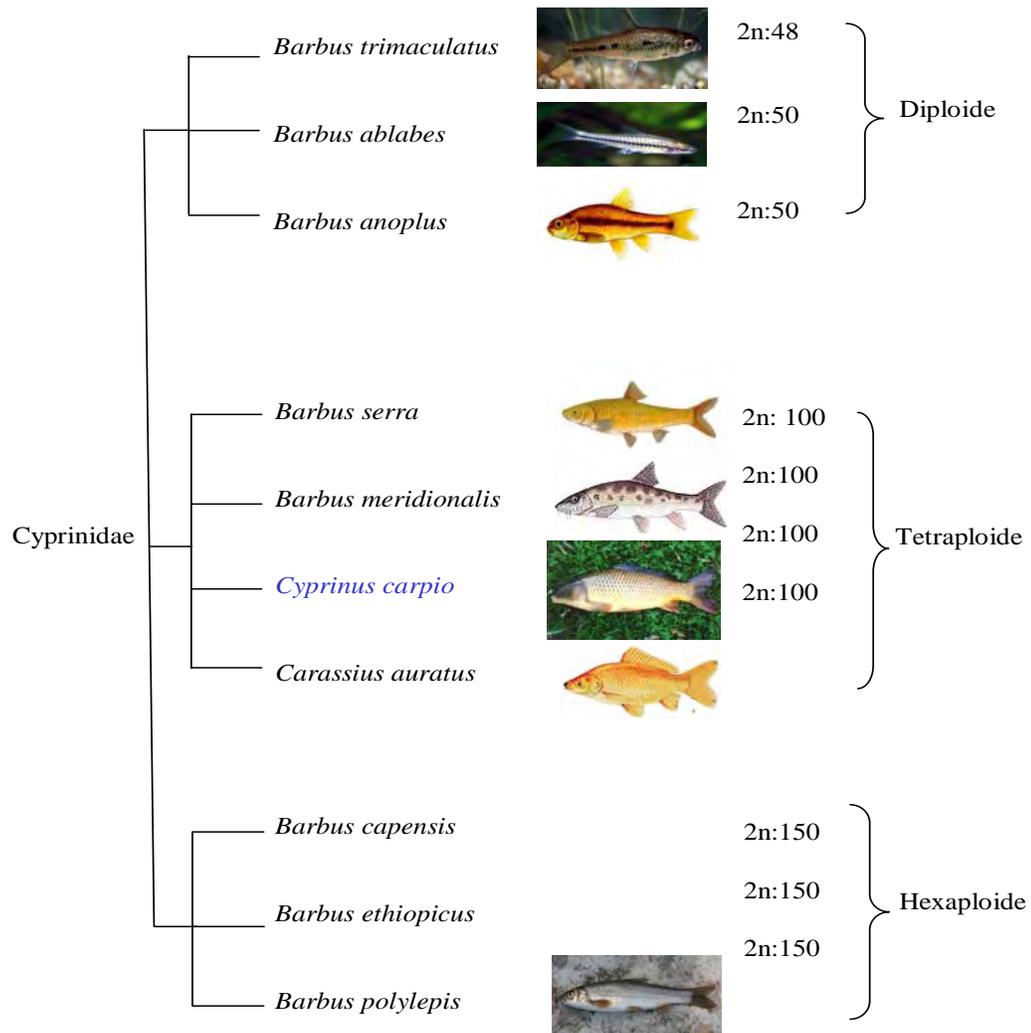
En mamíferos se observaron variantes de empalme del gen de Pit1 que producen proteínas parcialmente diferentes que presentan una modulación y especialización de la función de la proteína original (Demarco *et al.*, 2006). Así, mientras Pit1 regula la transcripción de los genes PRL y GH (Bodner *et al.*, 1988; Ingraham *et al.*, 1988), la variante de empalme Pit1<sup>a</sup>, una proteína que presenta una inserción de 26 aminoácidos en el dominio de transactivación de Pit1 producto de un procesamiento alternativo del RNA mensajero, no se une eficientemente al promotor del gen de PRL (Morris *et al.*, 1992). En pavo la variante de corte y empalme con el inserto  $\beta$  es un regulador menos efectivo del gen de PRL, pero regula eficientemente al gen de GH (Kurima *et al.*, 1998).

En peces no se han observado variantes de procesamiento alternativo del RNA mensajero transcrito del gen de Pit1 (Majumdar *et al.*, 1996). La proteína Pit1 de peces en la región del gen que codifica para la región transactivadora presenta secuencias adicionales que codifican para una región adicional en el exon I, denominada inserto  $\beta$  de 29 aminoácidos (homólogo a la

secuencia de 26 residuos de Pit1<sup>a</sup> en mamíferos), y un nuevo exon denominado exon  $\gamma$  que codifica para 33 aminoácidos coincidente con la unión del exon II y III de Pit1 en mamíferos, por eso Pit1 en peces tiene un mayor tamaño de aproximadamente 360 aminoácidos y en mamíferos 290 aminoácidos (Majumdar *et al.*, 1996; Lorens *et al.*, 1996).

En la familia *Cyprinidae* existen especies diploides con dotación cromosómica de 50 cromosomas, así como también especies tetraploides con un número de 100 cromosomas y además especies hexaploides con un número cromosómico de 150 cromosomas (Fig.3; Tsigenopoulos *et al.*, 2002). La carpa (*Cyprinus carpio*) experimentó la duplicación de su genoma unos 12 millones de años atrás además de las dos rondas (2R) de duplicación genómica al inicio de la radiación de vertebrados (David *et al.*, 2003). Consistente con la hipótesis de la ronda adicional de duplicación del genoma específica de peces, referida como 3R, un juego complejo de copias de genes están presentes en un único individuo (Hoegg y Meyer, 2005). La duplicación del genoma puede estar seguida tanto por la pérdida o inactivación de una de las copias duplicadas del gen; subfuncionalización, donde cada copia del gen adquiere un patrón de expresión temporal y/o espacialmente específico, y/o neofuncionalización donde una copia adquiere una función nueva (Ferris y Whitt, 1977; Hoegg y Meyer, 2005).

En el contexto de los estudios funcionales sobre genes de factores del eje hipotálamo-hipofisiario es muy importante recordar que la carpa es tetraploide y que los genes duplicados activos pueden existir en dos copias y cuatro alelos y podrían ser regulados diferencialmente (Hoegg y Meyer, 2005; Christoffels *et al.*, 2006). Se mostró que muchos genes duplicados son mantenidos activos en carpa, debido posiblemente a la ocurrencia relativamente reciente de la duplicación (Arends *et al.*, 1998; Futami *et al.*, 2001; Hermes *et al.*, 2002; Molina *et al.*, 2002; Figueroa *et al.*, 2005). Actualmente se sabe que existen dos copias de Pit1 en carpa (Kausel *et al.*,



**Fig.3: Relación filogenética y ploidia en la familia de los cyprinidae.** La relación filogenética, elaborado en base a la secuencia del citocromo *b*, el número cromosómico entre cyprinidae, adaptado de Tsigenopoulos et al., 2002.

1999), que existen transcritos de las dos copias del gen Pit1 según lo confirmado por los experimentos de RT-PCR (Salazar *et al.*, 2003). Además se mostró por hibridación *in situ* con oligonucleótidos gen-copia específica que existe una expresión diferencial a nivel de transcripción de los dos genes Pit1 en carpas aclimatizadas a invierno con mayor presencia de transcritos del gen-I en relación al gen-II (Kausel *et al.*, 2006).

En la región promotora río arriba de la secuencia codificante de los dos genes se predijeron por análisis *in silico* múltiples sitios de unión para factores de transcripción (Salazar, 2003). Se encontraron secuencias de consenso, entre otros para la unión de Pit1, AP-1, CREB que podrían estar involucradas en la activación célula específica del gen Pit1 durante el desarrollo y/o la modulación de la expresión de Pit1 por estímulos externos (Xu *et al.*, 1998). En base al análisis *in silico* de las secuencias 5'-regulatorias se plantea como **hipótesis de trabajo que los sitios de unión a factores de transcripción identificados en la región promotora del gen Pit1 son funcionales en la glándula pituitaria de *Cyprinus carpio*.**

Por eso se propone estudiar los posibles sitios de unión de factores de transcripción en las regiones del promotor proximal de los genes duplicados Pit1 por caracterización de la interacción DNA/proteína *in vitro*. Se desarrollará el ensayo de retardo de la movilidad electroforética de complejos DNA/proteína (ensayo EMSA) a partir de extractos de pituitaria de carpa para evaluar la funcionalidad de los sitios regulatorios de Pit1, el factor del sistema hipofisiario que juega un rol central en el control de la adaptación a cambios ambientales.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Reactivos

Sigma Chemical Co: azul de bromofenol, nonidet P-40, EDTA, EGTA, bromuro de etidio, RNAsa y DNAsa.

Merck (Darmstadt, Alemania): glicerol, ácido tricloroacético,  $MgCl_2$ , BSA.

Winkler y Zawadsky: SDS, cloruro de sodio, cloruro de potasio.

Invitrogen: “Random Primers DNA Labeling System”.

Amersham: POPOP.

Whatman: papel 3MM.

Promega: dNTPs, Tris, HCl.

Merck: El medio de cultivo MEM, tripsina, colchicina, giemsa, metanol y ácido acético fueron gentilmente donados por Dr. Milton Gallardo.

##### 3.1.2 Enzimas

Gibco BRL: enzimas de restricción *EcoRI*, *PstI*, y la enzima transcriptasa reversa (RT) Superscript.

Promega: las enzimas *BamHI*, *HindIII*, *Taq* Polimerasa, T4 DNA ligasa y su correspondiente tampón T4 DNA ligasa 5X (Tris-HCl 0,2M pH 7,6;  $Mg_2Cl_2$  0,1M; DTT 0,1M).

Invitrogen: DNAsa libre de RNAsa.

Life Technologies do Brasil Ltda: *Taq* polimerasa recombinante con su correspondiente tampón 10X (Tris-HCl 200mM pH 8,4; KCl 500mM) y  $Mg_2Cl_2$  50mM.

### 3.1.3 Animales de experimentación

Carpas adultas (*Cyprinus carpio*) de entre 30 y 40cm de largo fueron capturadas en el río Calle-Calle en Valdivia, Chile y mantenidas a temperatura y fotoperíodo natural por tres semanas en una jaula fija de 3 x 4m sumergida 2m en un afluente del mismo río. Las glándulas hipofisarias fueron disectadas y procesadas inmediatamente para preparación de RNA y extracto nuclear. Los riñones fueron disectados para preparación de cromosomas metafásicos.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Preparación de sitios para unión de factores nucleares

Los templados de DNA, un corto fragmento de DNA doble hebra, fueron preparados a partir de oligonucleótidos sintéticos (40pmol, 20pmol/ $\mu$ l), uno sense y uno antisense, apareados y marcados con  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (6000 Ci/mmol, 10mCi/ml, 25 $\mu$ l = 250 $\mu$ Ci, Amersham). Uno de los oligonucleótidos, el sense (20pmol, 20-mer), se marcó primero en el extremo 5' con polinucleótido quinasa (PNK) y  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP, y los nucleótidos no incorporados fueron separados por precipitación como sigue. El marcaje se realizó por 30 min a 37°C en un volumen total de 10 $\mu$ l, se llevó a un volumen final de 50 $\mu$ l agregando 0,25 $\mu$ l de glicógeno (stock 10ng/ $\mu$ l; conc.final 50ng/ml) como transportador, 5 $\mu$ l 3M NaAc pH5,4 y completado con agua, precipitado con tres volúmenes de etanol 100%, incubado 30 min a -20°C, centrifugado a 14.000rpm por 30 min a 4°C, el sedimento fue lavado una vez con etanol 70% y secado al aire. El oligonucleótido sentido marcado (20pmol) fue resuspendido en 39 $\mu$ l de agua, 10 $\mu$ l de tampón PNK 5x y 1 $\mu$ l de oligonucleótido antisentido (20pmol), la mezcla fue calentada en baño maria a 100°C por 10 min y enfriado a temperatura ambiente. Los fragmentos competidores no marcados fueron obtenidos agregando cantidades

equimolares de oligonucleótidos sense (30 $\mu$ l 100 $\mu$ M) y antisense (30 $\mu$ l 100 $\mu$ M), incubados en la presencia de sal (70mM Tris pH7.6, 100mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub> final), por 10 min a 100°C, enfriados a temperatura ambiente y almacenados a -20°C.

### **3.2.2 Determinación de la eficiencia del marcaje con <sup>32</sup>P**

El método usado para cuantificar la cantidad de <sup>32</sup>P radiactivo que se incorporó a los oligonucleótidos, fue el de precipitación con TCA (Sambrook et al., 1989), el cual mide cuentas precipitables en una muestra. Trabajando siempre en hielo para mantener una temperatura de aproximadamente 4°C en las soluciones, se tomó una alícuota de 1 $\mu$ l del tubo que contenía la reacción de marcaje radiactivo y se diluyó 50 veces en agua destilada para constituir la solución trazadora. De esta solución se tomaron dos alícuotas de 10 $\mu$ l y 20 $\mu$ l que fueron mezcladas en tubos de ensayos con 1 $\mu$ l de DNA de timo de ternera fragmentado y denaturado (coprecipitador) con una concentración de 1mg/ml, y 5ml de TCA 10% a 4°C. Las diluciones se incubaron en hielo por 15 min y luego fueron filtradas independientemente en membranas de nitrocelulosa de 25 $\mu$ m de diámetro de grado BA85 de 0,45 $\mu$ m (Schleicher y Schuell). Después de filtrar las mezclas, las membranas fueron lavadas tres veces con TCA frío más un último lavado con alcohol de 95°. Se secaron bajo campana y en horno de secado junto a una membrana con 1 $\mu$ l de la solución trazadora aplicada directamente. Las membranas secas fueron dispuestas, por separado, en viales de vidrio con 3,5ml de solución de centelleo PPO-POPOP (4g PPO y 0,1g POPOP en 1L de tolueno) para el conteo de cuentas precipitables usando un contador de centelleo Packard Tri-Crab 1600TR.

### 3.2.3 Preparación de extracto nuclear de hipófisis de carpa

Los extractos nucleares de pituitaria de carpa se prepararon a partir de una hipófisis (aproximadamente 30mg) la cual se homogenizó por tres golpes en un homogenizador en 1ml de tampón hipotónico enfriado en hielo (10mM Hepes pH 7,9, 10mM KCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA, 1mM DTT, 0,5mM PMSF), se incubó 15 min en hielo, se homogeneizó con tres golpes más y se centrifugó (30 s, 12.000 x g, 4°C). El sedimento enriquecido en núcleos se resuspendió en 100µl de tampón de unión 4X (20mM Hepes pH 7,9, 400mM KCl, 20% Glicerol, 2mM DTT, 0,5mM PMSF). Para abrir los núcleos, el lisado se congeló en nitrógeno líquido, fue descongelado en hielo, centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 30 min. Se trasladó el sobrenadante a un nuevo tubo y se descartó el sedimento de DNA genómico. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976), usando BSA como estándar. El sobrenadante, el extracto nuclear, se alicuotó y se almacenó a -80°C.

El extracto nuclear de células de cultivo se preparó según (Caccavelli *et al.*, 1998).

### 3.2.4 Reacción de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

Las reacciones de unión (Caccavelli *et al.*, 1998) fueron realizadas con 2µg de extracto de proteínas nucleares, 1µg de poli (dI:dC) y 80000 cpm de fragmentos de DNA marcados con <sup>32</sup>P en 5mM Hepes pH 7,8, 100mM KCl, 0,5mM DTT, 5% (v/v) glicerol. Para los experimentos de competencia se agregó 200 veces exceso molar de sitio de unión no marcado. Las reacciones fueron incubadas a temperatura ambiente por 15 min y cargadas en un gel precorrido de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 40:1) 4% (p/v). Los geles fueron corridos a 4°C en tampón TBE 0,5x (44,5mM Tris, 44,5mM ácido bórico, 1mM EDTA) a 150 V, secado y expuesto a una pantalla-K de

rayos X para capturar la imagen (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) que fue analizada en un sistema molecular de imagen FX (BioRad).

### **3.2.5 Conjugación de oligopéptido de Pit1 de carpa a hemocianina**

A 2mg de oligopéptido disuelto en 225 $\mu$ l de tampón borato de sodio 0,5M pH 9 equilibrado en NaOH 5N se agregó 1mg de hemocianina. Lentamente se agregó el glutaraldehído (77 $\mu$ l de glutaraldehído 2,5%, diluido en tampón borato 0,5M pH 9 equilibrado en NaOH 5N). Se agitó la mezcla aproximadamente 15h en vortex a temperatura ambiente. Luego se realizó diálisis del oligopéptido conjugado en una bolsa de diálisis con tamaño de exclusión de 12kDa contra 0,15M NaCl (200ml) frío. Se dejó toda la noche con agitación suave a 4°C. Se cambió el tampón a solución fresca de tampón borato 0,5M pH 9 equilibrado en NaOH 5N y se dializó el oligopéptido por otras 4 h. El oligopéptido conjugado a hemocianina se almacenó en tubos Eppendorf con concentración final 5 $\mu$ g/ $\mu$ l a 4°C.

### **3.2.6 Inmunocitoquímica**

La inmunocitoquímica se realizó en base al método del complejo peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) (Sternberger *et al.*, 1970). Primero, los cortes fueron desparafinados con xilol y luego rehidratados por medio de una batería decreciente de etanol, desde etanol 100% hasta etanol 50%. Luego se incubaron por 10 min con perhidrol 3% en metanol, con el fin de gastar las peroxidases endógenas del tejido. Se lavaron con PBS 1x (NaCl 8g, KCl 0,2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24g pH 7,4) por 5 min y se incubaron por 30 min con solución de bloqueo (leche descremada 5%, BSA 1%, en PBS 1x) incubaron los cortes con el anticuerpo primario, un suero anti-cPit1 de conejo, diluido en solución de bloqueo por toda la noche (mínimo 12 h) a 20°C en

cámara húmeda. Transcurrido dicho tiempo, se lavaron las secciones tres veces por 5 min con PBS 1x y luego se incubaron con el segundo anticuerpo anti-IgG de cabra diluido en solución de bloqueo 1:1000 por 30 min a 20°C en cámara húmeda. Se les realizaron nuevos lavados con PBS 1x, 3 veces por 5 min, para ser incubados por 30 min con PAP (complejo peroxidasa anti-peroxidasa) diluido en solución de bloqueo. Luego de tres nuevos lavados con PBS se agregó sobre los cortes la solución de revelado (40ml PBS, 30µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 2ml DAB (diaminobenzidina 20mg/ml) por 10min), y 10 min más tarde se adicionaron otros 15µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% y se dejó otros 5 min.

Se lavaron nuevamente tres veces con PBS 1x y se procedió al montaje de los cortes utilizando una batería de etanol en concentraciones crecientes, desde 50% hasta 100%. Finalmente se trataron con xilol, fueron montados con bálsamo de Canadá y se les colocó un cubreobjeto para ser observados en microscopio.

### **3.2.7 Preparación de cromosomas metafásicos de carpa**

La preparación de cromosomas en metafase se llevó a cabo en base a un protocolo modificado (Ojima *et al.*, 1979; Yamamoto *et al.*, 1973) El riñón y pronefro de carpas sacrificadas fue extraído con material quirúrgico estéril y depositado con pinzas autoclavadas en una placa de Petri, también autoclavada. Seguido de esto, bajo una cámara de flujo laminar, el órgano fue disgregado con tijeras y pinzas estériles. Con la pinza se traspasaron los trozos de tejido a un Falcon de 15ml estéril y se lavó con 3ml de PBS 1x. Se centrifugó a 3900 x g, se descartó el sobrenadante y el sedimento de células se lavó una segunda vez con 3ml de PBS 1x. Se centrifugó a 3900 x g, se descartó el sobrenadante y desde el sedimento se traspasaron con pinzas estériles cinco trozos pequeños de tejido sobre la base de un frasco de cultivo celular sin

medio de cultivo MEM. Los trozos de tejido se dejaron dentro del frasco por 5 min y luego se agregó 45 gotas de MEM 5% FCS con antibiótico y antifúngico (concentración final: penicilina G 10.000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y amphotericina 25.000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) usando una pipeta Pasteur. El frasco se agitó muy suavemente y se dejó en una caja plástica a temperatura ambiente en la sala de cultivo celular. Se realizó una observación de las células al microscopio al tercer día, observándose células adheridas a la base del frasco. El mismo día se descartó el medio del frasco y se agregó 45 gotas más del mismo medio de cultivo MEM 5% FCS bajo cámara de flujo laminar usando material estéril. Al cuarto día se agregó en los frascos 15 gotas de medio de cultivo MEM 5% FCS. Este medio de cultivo fue centrifugado a 2000 rpm 5 min a temperatura ambiente antes de usarlo para descartar cualquier impureza. Al quinto día se agregó 3 gotas de colchicina 0,005% (p/v) al frasco de cultivo y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Luego el medio del frasco fue retirado y recolectado en un Falcon de 15ml estéril. Las células adheridas a la base del frasco fueron tratadas con 700 $\mu\text{l}$  de tripsina 1x (al 0,1 % en solución de CaCl 0,4% pH 7,8) y se incubó por 3 min a temperatura ambiente. Las células despegadas del frasco fueron agregadas al medio contenido en el Falcon. El frasco fue golpeado contra la mano para soltar las últimas células adheridas, se lavaron con el mismo medio y se devolvieron al Falcon. Se centrifugó a 1200rpm por 7 min y el sedimento fue resuspendido en 5ml de KCl 0,075M suavemente y se incubó 20 min a 37°C. Se centrifugó a 3900 rpm por 15 min y el sedimento fue resuspendido suavemente en 2,5ml KCl 0,075M: 2,5ml solución de fijación. La solución de fijación contiene metanol: ácido acético en relación 3:1. Se centrifugó a 1200 rpm por 5 min a temperatura ambiente. El sedimento fue resuspendido en 5ml de solución de fijación. Se centrifugó a 1200 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Se resuspendió en 1ml de solución de fijación en un tubo de centrifuga de vidrio. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante por inversión del tubo suavemente. Se

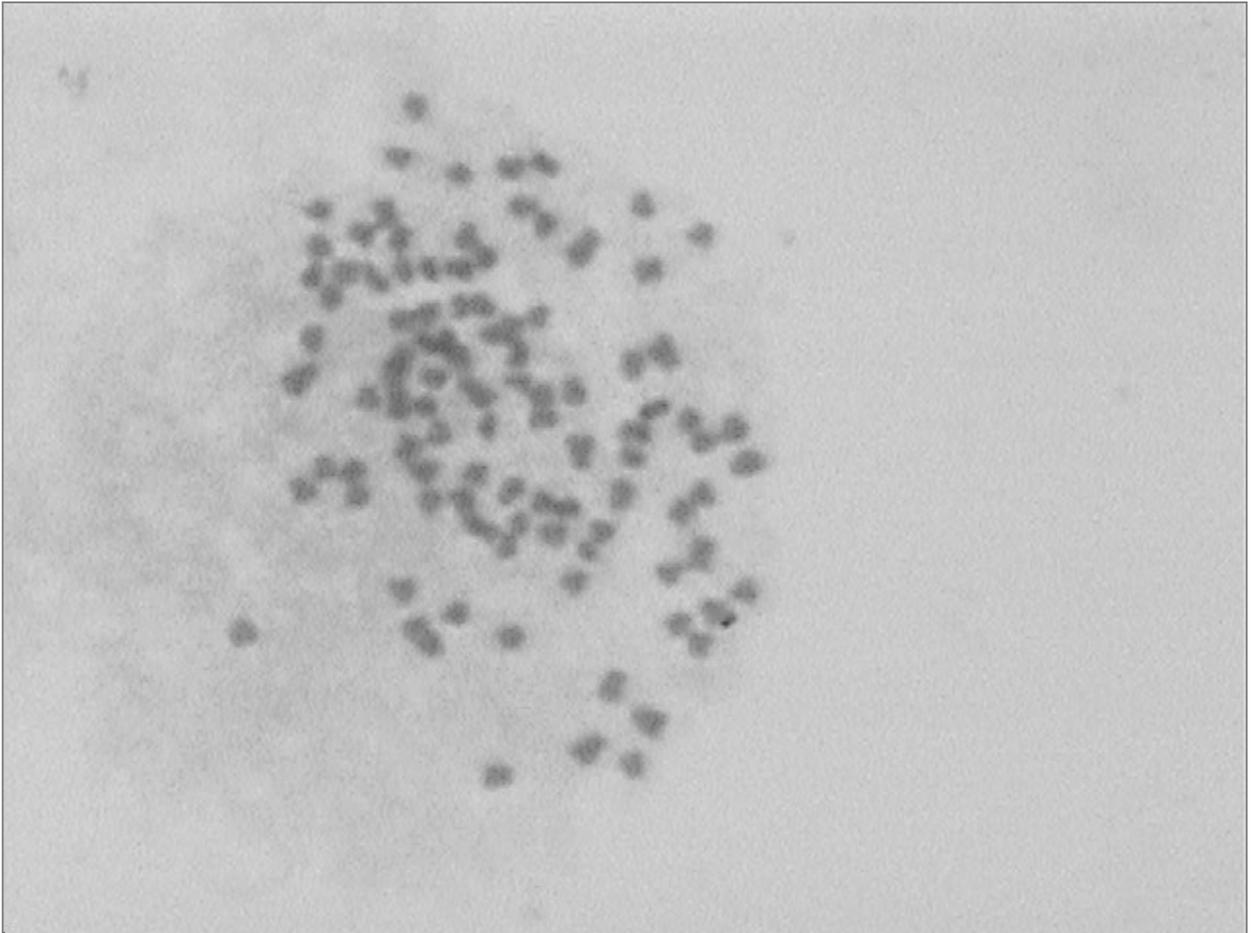
resuspendió en 1ml de solución de fijación, se tomó 20 $\mu$ l con pipeta automática y se dejaron caer a 30 cm aproximadamente sobre un portaobjeto limpio y previamente sumergido en agua destilada. Se dejó secar a temperatura ambiente y se tiñó con Giemsa 4% por 3-4 min. Finalmente se observó al microscopio y se tomó fotografía que fue guardada como archivo en el computador del laboratorio.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Cien cromosomas constituyen el complemento tetraploide de *Cyprinus carpio*

De las carpas obtenidas de la agua del río Calle-Calle se caracterizó el cariotipo para confirmar la duplicación del genoma de las carpas en estudio. Varios métodos fueron aplicados para obtener cromosomas de carpa según los protocolos descritos por Ojima y Takai (1979; 1987; 1982). Las preparaciones de cromosomas a partir de eritrocitos y linfocitos no proporcionaron los resultados esperados (dato no mostrado). Los extendidos de cromosomas obtenidos a partir de células de riñón, usando un método de incubación directa con colchicina después de disgregar el tejido de riñón (Takai y Ojima, 1987), fueron irregulares en su forma y distribución e insuficientes en número. Esto podría deberse a que las carpas obtenidas del río Calle – Calle fueron siempre adultas, con peso sobre 2 kg y con baja tasa mitótica de sus células con respecto a lo que se esperaba observar en una carpa más joven. Finalmente, se adaptó el protocolo descrito por Yamamoto y Ojima (1973), con el cual el cultivo primario de corto plazo de células de riñón anterior de carpa permitió la obtención de extendidos de cromosomas de tal manera que se pudieron contar (Fig.4).

Las placas de cromosomas metafásicos preparados de células de riñón permitieron observar el tamaño y número de los cromosomas (Fig.4). Claramente se muestra un número de 100 cromosomas (Fig.4). Este cariotipo se confirmó en ocho individuos y esto sugiere que las carpas del sistema acuático cerca de Valdivia poseen un complemento tetraploide.



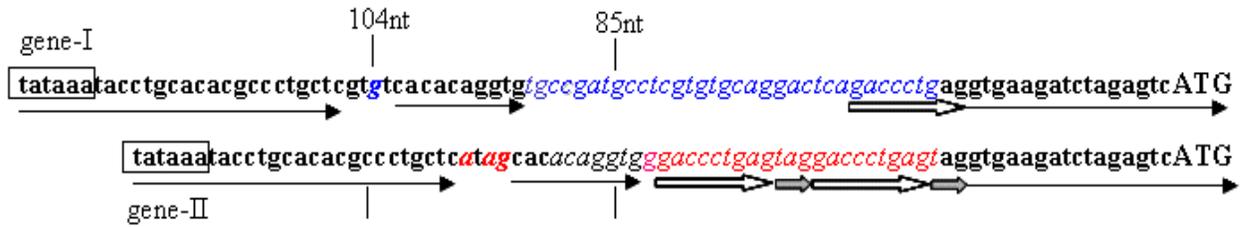
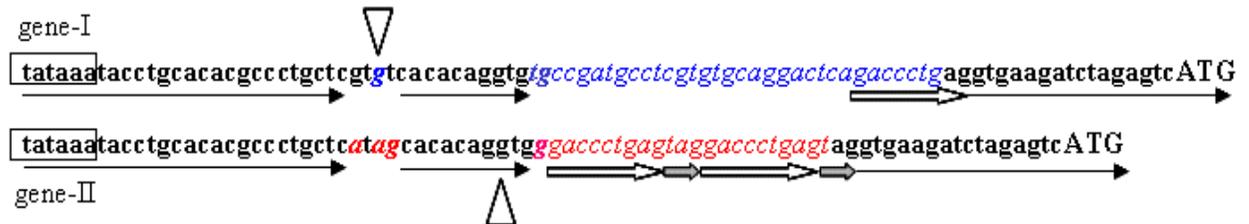
**Fig.4: Cromosomas metafásicos de *Cyprinus carpio*.** Se aprecian los 100 cromosomas del complemento tetraploide de la carpa.

#### **4.2 Los promotores de los dos genes Pit1 han divergido significativamente desde la duplicación**

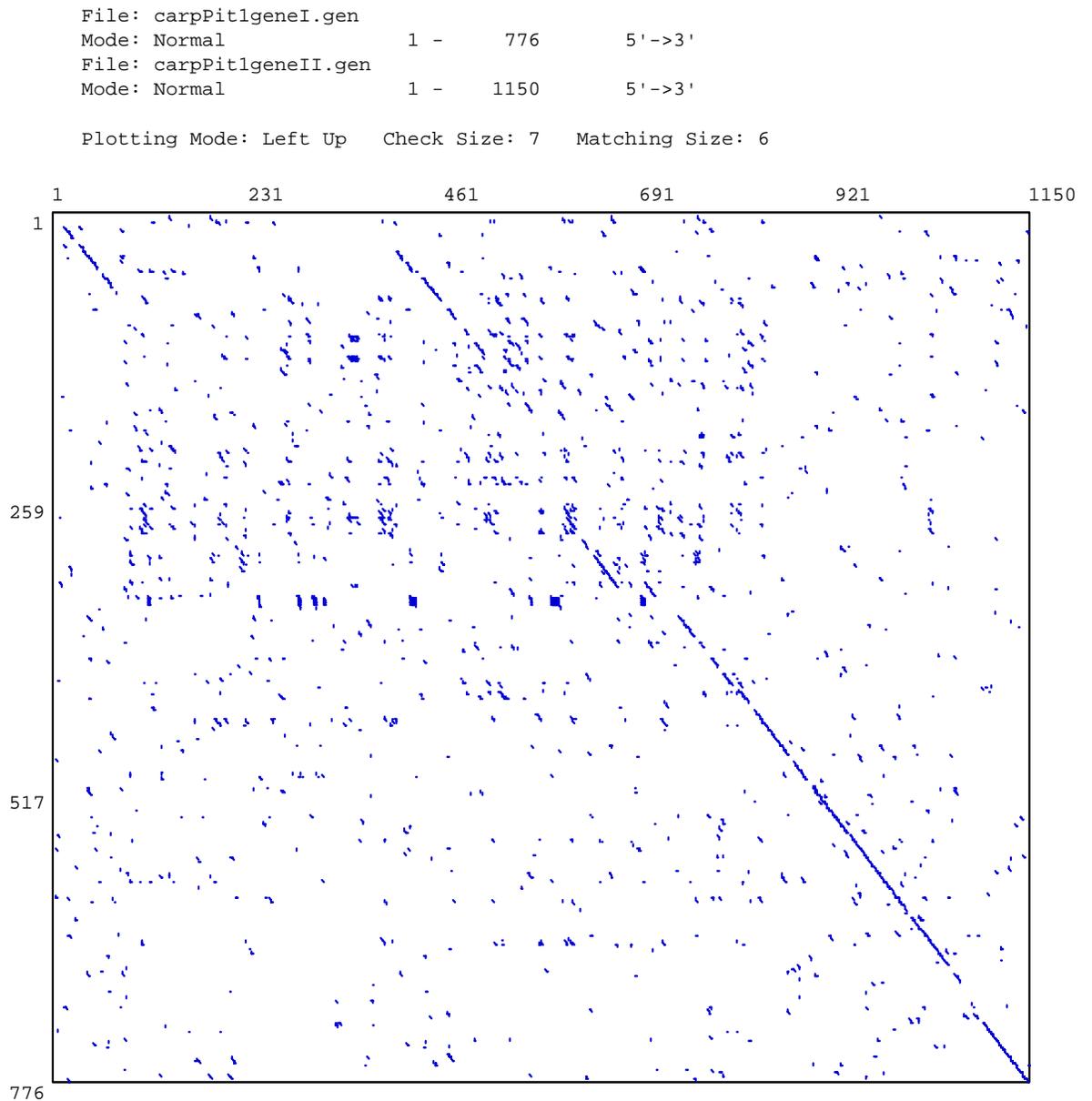
Con el fin de vislumbrar los mecanismos de control transcripcional de los genes duplicados Pit1, se obtuvo la secuencia del promotor proximal del gen-I de Pit1 contenido en el recombinante pGP4<sub>776</sub> (número acceso AF273789). Los análisis de secuencia revelaron la presencia de 41pb de secuencia codificante, como se esperaba, y 735pb río arriba del codon de inicio de la traducción ATG. Una caja TATA se observa a 91pb río arriba del ATG (Fig. 5). Más aún, los análisis confirmaron que este gen (gen-I), de hecho codifica el cDNA identificado previamente (Kausel *et al.*, 1999). Cuando la secuencia del promotor del gen-I (776pb) fue comparada contra la correspondiente región del gen-II (1150pb) en un análisis de tipo matrix-dot-blot, las diagonales en el gráfico revelaron regiones altamente conservadas, así como también la falta de puntos alineados indican dominios completamente divergentes (Fig. 6).

Un 49% de nucleótidos idénticos se concentraron en el exon I y 300pb adyacentes en dirección 5', además de tres regiones de menor extensión más río arriba espaciadas por secuencias completamente divergentes (Fig.6).

En la región entre la caja TATA y el codón de inicio AUG se observaron módulos diferentes en las dos copias del gen Pit1. La distancia entre la caja TATA y el ATG en el gen-I (91pb) es 10pb más larga que la distancia respectiva en el gen-II (81pb); la diferencia del largo resulta de los cambios en una región definida. Para esta región de 26 nucleótidos comenzando en la posición -51 relativa al sitio de inicio de la traducción en el gen-I, no pudo ser encontrado ningún apareamiento en el gen-II (Fig. 7). Esta divergencia también se presentó en la interrupción al final de la diagonal más larga en la esquina derecha del grafico de matriz de punto (Fig. 6). El resto de esta región promotora proximal de 353pb (posición 424-776 en el gen I, 806-1150 en el gen II)

**A****B****C****D**

**Fig.5: Arquitectura del promotor de los genes duplicados de Pit1 de carpa.** Alineamiento de la secuencia del promotor proximal gen-I y gen-II favoreciendo la identidad del (A) exon I y (B) TATA-box; (C) y (D) Posibles estructuras secundarias intramoleculares en la región entre el TATA-box y ATG inicio de traducción. Cursivo: regiones gen copia especifica, azul del gen-I, rojo del gen-II; flecha segmentada: regiones idénticas en los dos promotores; flecha continua: secuencia repetitiva; líneas verticales: posición del tamaño del fragmento de extensión de partidor; triangulo abierto: sitio de inicio de la transcripción (tss).



**Fig.6: Matrix dot blot del alineamiento de las secuencias promotoras de los dos genes Pit1.**

Los diagonales en el Matrix-dot blot indican regiones de secuencias idénticas entre secuencias promotoras, 776bp del gen-I (Acc.No.AY273789) y 1150 bp del gen-II (Acc.No.AF132287) río arriba del codon de inicio de la traducción.



**Fig.7: Posibles sitios de unión de los dos genes Pit1 de carpa.** Alineamiento de la secuencia del gen-I y gen-II; “-”: gap; “\*”: nucleótidos idénticos; subrayado: secuencia consenso del sitio de unión con factor de transcripción, en color: sitio de factor de transcripción específico.

está altamente conservada (88,1% de identidad, 311/353). Más río arriba, dos dominios altamente conservados están presentes, desde la posición 11-67 en el gen-I hasta la posición 12-71 en el gen-II (identidad 91,7%, 55/60), y 303-344 en el gen-I a 634-665 en el gen-II (96,8%, 30/31). La región que separa las dos regiones homólogas más distantes contiene una gran inserción 563pb en el gen-II relativo al gen-I.

Otros aspectos comparativos fueron derivados por inspección manual de la región entre la caja TATA y el codon de inicio de la traducción ATG de los dos genes Pit1 de carpa (Fig.5). Las secuencias codificantes y 18pb río arriba del ATG son idénticos. En el extremo 5', la caja TATA y los siguientes 40pb son idénticos, excepto por 4 nucleótidos localizados entre los 26pb y los 30pb río abajo de la caja TATA (Fig.5). En realidad, el gtgt en el gen-I es cambiado por atag en el gen-II, embebido en una secuencia invariable (Fig.5). En suma, un elemento gaccctgag fue detectado una vez en el gen-I entre los -25 a -17 relativos al ATG, mientras que esta secuencia se presentó dos veces en el gen II en la región divergente, posiciones -40/-32 y -28/-20 relativo al codon de inicio de la traducción, este último flanqueado por una repetición pequeña directa de 3pb (-31/-29 y -19/-17); estos tripletes están ausentes en la correspondiente copia única en el gen-I y por lo tanto indican una duplicación del elemento en el gen-II respecto al gen-I y no una pérdida del elemento en gen-I respecto al gen-II (Fig.5). Los sitios de inicio de la transcripción (tss) fueron determinados por análisis de "extensión de partidores" (Carey y Smale, 1999; Kausel *et al.*, 2006). Debido a las secuencias altamente conservadas entre los dos cDNAs de Pit1, una única reacción fue realizada usando un partidor antisentido específico del exon I marcado para aparear con ambos mRNAs. En conjunto con algunos fragmentos de menor tamaño, un producto mayoritario de 104 nucleótidos fue observado, sugiriendo que los transcritos de Pit1 del correspondiente tamaño 5'-UTR predominaron en RNA total de pituitaria de carpa (Fig.5). La

banda menos intensa correspondiente a un fragmento de 85 nucleótidos, sugirió que también estaba presente un mRNA de menor tamaño 5'UTR de Pit1. Se propone que el producto mayor corresponde a transcritos del gen-I, basado en tres argumentos independientes. Primero, la proyección del fragmento de 104 nucleótidos de la secuencia del gen-I de Pit1, sitúa el sitio de inicio de la transcripción en una G 29 nucleótidos río abajo de la caja TATA, una distancia esperada para promotores eucarióticos que contienen caja TATA (Fig.5). Segundo, el 5'-cDNA reportado previamente (Kausel *et al.*, 1999) comienza 32 nucleótidos río abajo de la caja TATA, consistente con el tss localizado 3pb río arriba. Esta última observación también excluye que el tss este localizado 20pb río abajo, como sería sugerido por la señal de 85 nucleótidos en el experimento de extensión de partidor. El cDNA de Pit1 de carpa grass (depositado en GenBank número de acceso AY694156) está más relacionado al gen-I de Pit1 de carpa y comienza en una posición similar (Fig.8). Por otra parte, la proyección del fragmento de 104 nucleótidos en el gen-II de Pit1, situaría el tss del gen-II en una C 19 nucleótidos río abajo de la caja TATA, una distancia improbable para la iniciación de la transcripción (Fig.5). Tercero, el tss predicho de Pit1 de pez zebra coincide en secuencia y posición con el arreglo del gen-I (Fig.8). Más aún, el sitio inr del gen-I ctcgtgt muestra 71% (5/7) de nucleótidos idénticos con el sitio inr consenso de mamífero py, py, A, N, T/A, T/C, T/C (Fukue *et al.*, 2005) comparado con la secuencia alineada del gen-II ctcatag el 57% (4/7) de nucleótidos idénticos. Similarmente, la secuencia localizada 30pb río abajo del tss del gen-I (cctcgtg) muestra un 71% (5/7) de nucleótidos idénticos con la secuencia de consenso del elemento promotor río abajo (down stream promoter element, DPE) G/A, G, T/A, C, G, T, G (Fukue *et al.*, 2005). En consecuencia, el producto más corto de la extensión de partidor (85 nucleótidos) es propuesto como producto del gen-II basado en las siguientes observaciones: primero, la expresión de ambos genes está claramente demostrada

```

Cc gene-II  ggccgcatggtttgctaacaagcaagagctcattaacatggatg-aggtggtctgaggggctcagtataaatacctgcac
Cc gene-I   ggccgcatggtttgttaacaagcaagagctcattaacagggatgga ggggctctgagggg-ctcagtataaatacctgcac
zf gene     ggc-----tg-tt-ct-a-----tgggctcattaacatggatg-aagggctcaga gggg-ctccgcttaaatacctgcag

gene-II
Cc gene-II  a c g c c c t g c t c a t a g c a c a c a g g t g g g a c c c t g ----- a g t a g g a c c c t g a g t a g g t g a a g a t c t a g a g t c A T G
Ci cDNA     a c a c a g g t g g g c t g c t g t c g c a c g t g c a g g a c a c a g a c c c c g a g t ----- a t c t a g a g t c A T G
Cc 5' cDNA  a c a c a g g t g t g c c g a t g c c t c g t g t g c a g g a c t c a g a g c c t g a g g t g a a g a t c t a g a g t c A T G
Cc gene-I   a c g c c c t g c t c g t g t c a c a c a g g t g t g c c g a t g c c t c g t g t g c a g g a c t c a g a c c c t g a g g t g a a g a t c t a g a g t c A T G
zf gene     t t g c c c a g t t - g t g t c a c a c g g t g - g c c g a t g ----- a a g a g t c A T G
zf cDNA     g t c a c a c g g t g - g c c g a t g ----- a a g a g t c A T G
gene-I     +1                                     +30

```

Cc: common carp *Cyprinus carpio*, gene-II AF132287, gene-I AY273789, 5' cDNA AF096863;  
zf: zebrafish *Danio rerio*, gene in contig 10298 (zfin.org), cDNA NM212851;  
Ci: grass carp *Ctenopharyngodon idella*, cDNA AY694156.

**Fig.8: Alineamiento de la región cis-regulatorios del factor de transcripción Pit1 en Cyprinidae.** (A) Elementos funcionales en el alineamiento de la secuencia entre el TATA-box y ATG de los dos genes Pit1 de peces Cyprinidae. +1: inicio de la transcripción; +30: DPE downstream promoter element. Guión: gap.

(Kausel *et al.*, 2006); segundo, el tss deducido está localizado en una G 38 nucleótidos río abajo de la caja TATA, una distancia razonable para la iniciación de la transcripción en el gen-II; tercero, 3 de 4 nucleótidos que componen el sitio +1 en el gen-I (gtgt) están alterados en el sitio correspondiente en el gen II (atag) que podría relacionarse a cambios en la funcionalidad (Fig.5). Solamente en combinación con el tss propuesto en caggtgg en el gen-II, un DPE ocurre en la respectiva posición +30 (gtagtg, 5/7). El análisis exhaustivo de la región reveló además posibles estructuras secundarias (Fig.5). Empezando la secuencia a partir del TATA-box se destaca por flechas invertidas la región de cinco nucleótidos en el gen-I y de cuatro nucleótidos en el gen-II que podría formar un apareamiento intramolecular (Fig.5). Eso implicaría una ubicación similar del sitio de inicio de transcripción por ambos genes.

#### **4.3 Sitios de consenso unen factores nucleares específicos de pituitaria de carpa**

Para investigar elementos cis-regulatorios que podrían jugar un rol en una regulación diferencial de los dos genes Pit1 duplicados de carpa, se analizaron las secuencias promotoras aisladas para la presencia de putativos sitios de unión a factores de transcripción. Tomando en cuenta los puntajes más altos para secuencias de consenso obtenidas con dos programas independientes (Tess: <http://www.cbil.upenn.edu/tess/> y MatInspector: <http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl>), sitios de unión fueron predichos para Pit1, AP1, CREB y el factor de transcripción que responde a metales MTF1 (Fig.7 y 9). Los posibles sitios de unión del factor de transcripción Pit1 se nombraron ccP1 y ccP2 (exclusivamente presente en gen-II), ccP3 y ccP4 (presente en los dos genes), ccP5 y ccP6 (presente exclusivamente en gen-I). Se examinaron algunos de estos potenciales sitios de unión

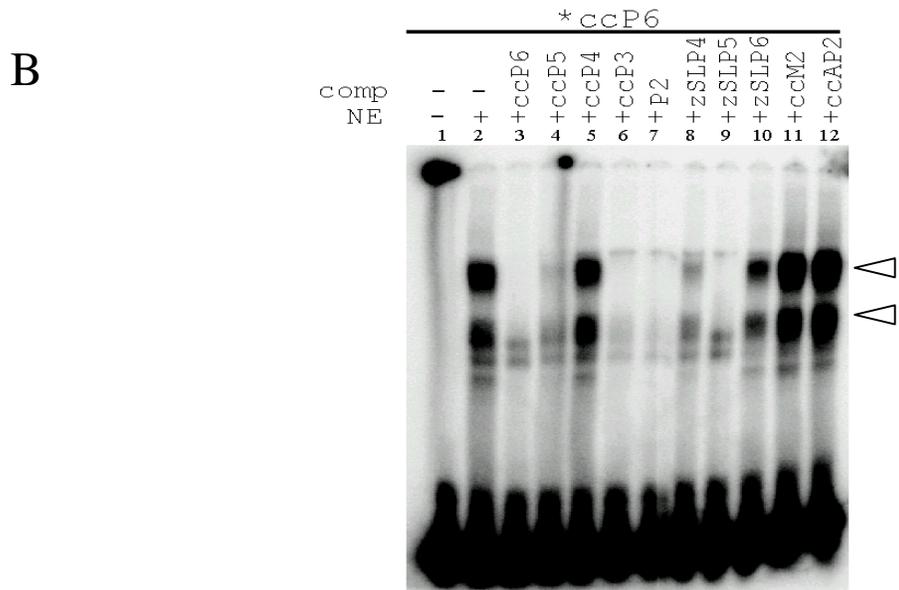
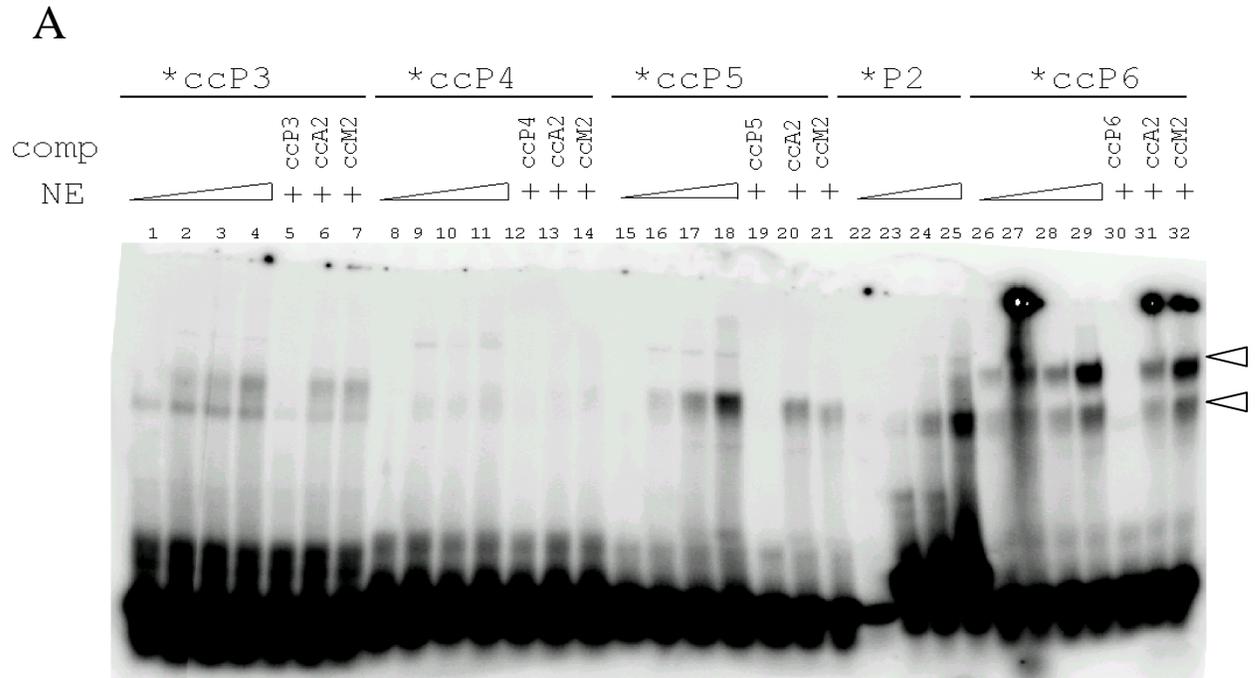
sitio		(AF273789)	(AF132287)
		gen-I	gen-II
ccP1	5'-CTTTGAACATGATTTTTAAAGC-3'	-	126-148
ccP2	5'-GCTTTTTTGTAGTAAATCATATTTTG-3'	-	286-312
ccP3	5'-GAGCTCATTAACATGGATGAG-3'	605-625	989-1009
ccP4	5'-CTCCATACTTATGCAACTGGAC-3'	374-395	-
ccP5	5'-GGTTTAATACTCATGCATTTTT-3'	323-345	(655-665)
ccP6	5'-TTTATAAATATTCATGTGCTCCTC-3'	277-300	-
ccA1	5'-GTAAT <b>CAGACT</b> CATTCCCTC-3'	-	765-784
ccA2	5'-GAGCTTT <b>GCCTCAGCGGGCCG</b> -3'	564-584	947-967
ccC1	5'-CAGTGGG <b>CCGTCATGGTTTGC</b> -3'	575-595	959-979
ccM1	5'-CGATGCCTCGTGTGCAGGAC-3'	688-707	-
ccM2	5'-ATACCT <b>GCACACGCCCTGCTC</b> -3'	242-262	1033-1053

**Fig.9: Secuencias cis-regulatorias de los dos genes Pit1 de carpa.** Secuencias de oligonucleótidos contenidas en los fragmentos utilizados para el análisis EMSA, solamente se muestra la secuencia sentido; **negrita**: secuencia de consenso; entre paréntesis número de acceso GenBank y los números indican la posición correspondiente en la secuencia del gen-I y gen-II de Pit1 de carpa

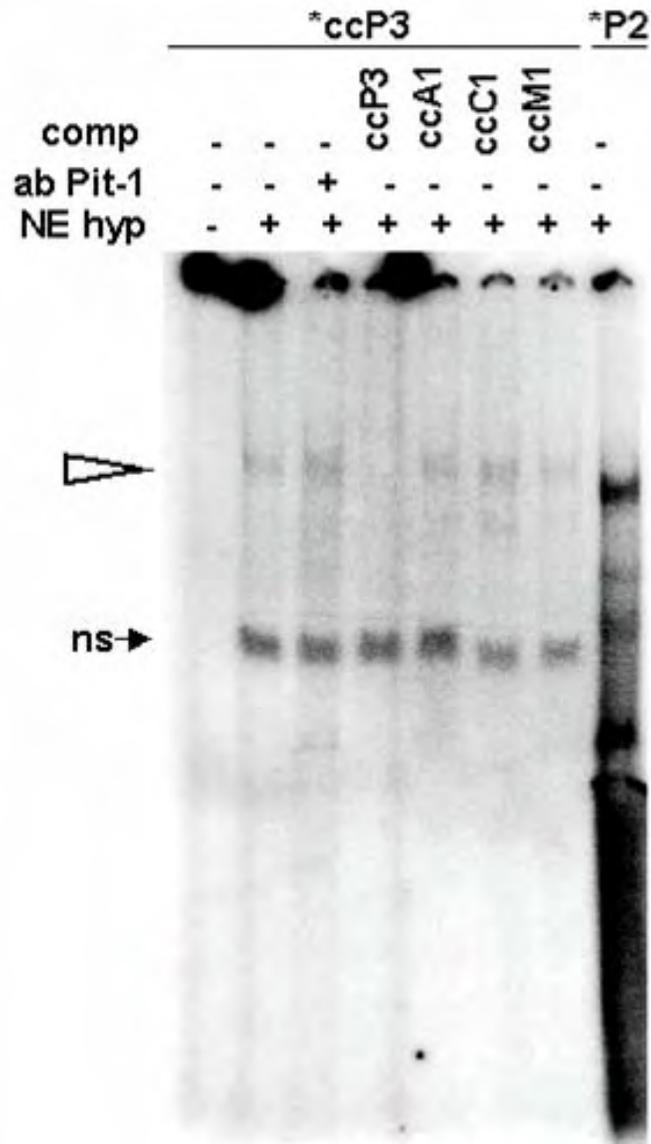
por su capacidad de unir factores nucleares extraídos de pituitaria de carpa. La calidad de estos extractos nucleares se comprobó usando el sitio canónico de unión de Pit1, el sitio P2, derivado del promotor del gen de la prolactina humano (Caccavelli *et al.*, 1998) en ensayo EMSA (no mostrado). Se analizaron los complejos entre el corto fragmento de DNA marcado con factores nucleares fraccionándolos por medio de un ensayo de retardo de la movilidad electroforética. Con extracto de línea celular que expresa Pit1 se mostró claramente complejos formados con los sitios ccP3, ccP5 y ccP6, y más débilmente con el sitio ccP4 (Fig. 10). Con el putativo sitio de unión Pit1 ccP3, presente en ambos genes Pit1 de carpa, se obtuvo un complejo específico con extracto nuclear de pituitaria de carpa (Fig.11), el cual compitió con un exceso de sonda ccP3 o ccM1 no marcado, este último corresponde a sitio de unión para el factor de transcripción MTF-1 exclusivo del promotor del gen-I de Pit1 de carpa, pero no con ccA1 o ccC1, sitio de unión para el factor de transcripción AP-1 y CREB, respectivamente. Sorprendentemente, el complejo específico en ccP3 no fue afectado con la adición de anticuerpos contra Pit1, sugiriendo que este consiste en una diferente isoforma de Pit1 o un factor completamente diferente. Cuando el putativo sitio de unión a CREB ccC1 fue usado, se observó un complejo que desapareció con la adición de sonda ccC1 no marcada en exceso, pero no en presencia de los sitios no marcados ccA1 o ccP1, este último es sitio de unión para Pit1. Un anticuerpo específico contra CREB/ATF-1 humano afectó la formación de este complejo que confirma la identidad del factor en el complejo (Fig.12).

Con el fin de encontrar una posible regulación diferencial de los genes duplicados Pit1 de carpa, se analizó la región divergente cerca del sitio de inicio de la transcripción. Cuando una sonda correspondiente a ccM1, presente sólo en el promotor del gen-I, fue analizada en presencia de extracto nuclear de pituitaria, se observó un complejo específico, el cual desapareció con un

exceso de ccM1 no marcado, pero no con ccC1, ccA1, ccP1, ccP2 (Fig.13). Una competencia débil fue observada con ccP3. Los resultados indican que los putativos sitios de unión comunes en ambos genes Pit1 de carpa, ccP3, ccC1 y ccM2 fueron capaces de reconocer factores nucleares específicos presentes en extracto de pituitaria de carpa, así como los putativos sitios de unión exclusivos del gen-I de Pit1, ccP5, ccP6 y ccM1, también fueron capaces de unir específicamente factores hipofisarios (Fig.14).



**Fig.10: Análisis de los posibles sitios de unión del factor de transcripción Pit1 en la región cis-regulatoria del gen-I y gen-II de Pit1 de carpa por EMSA.** Los sitios de unión para Pit1: ccP3, ccP4, ccP5 y ccP6 fueron analizados con extracto nuclear de línea celular GH3B6 (NE) en aumento (triángulo alargado) en presencia (+) y ausencia (-) de competidores. P2: sitio consenso canónico para Pit1; zSLP4, zSLP5, zSLP6: sitios de unión para Pit1 en el promotor del gen de somatolactina de pez cebra; ccM2: sitio de unión para MTF-1; ccAP2: sitio de unión para AP-1. Triángulo indica interacción específica. (Extraído de Kausel et al, 2006)

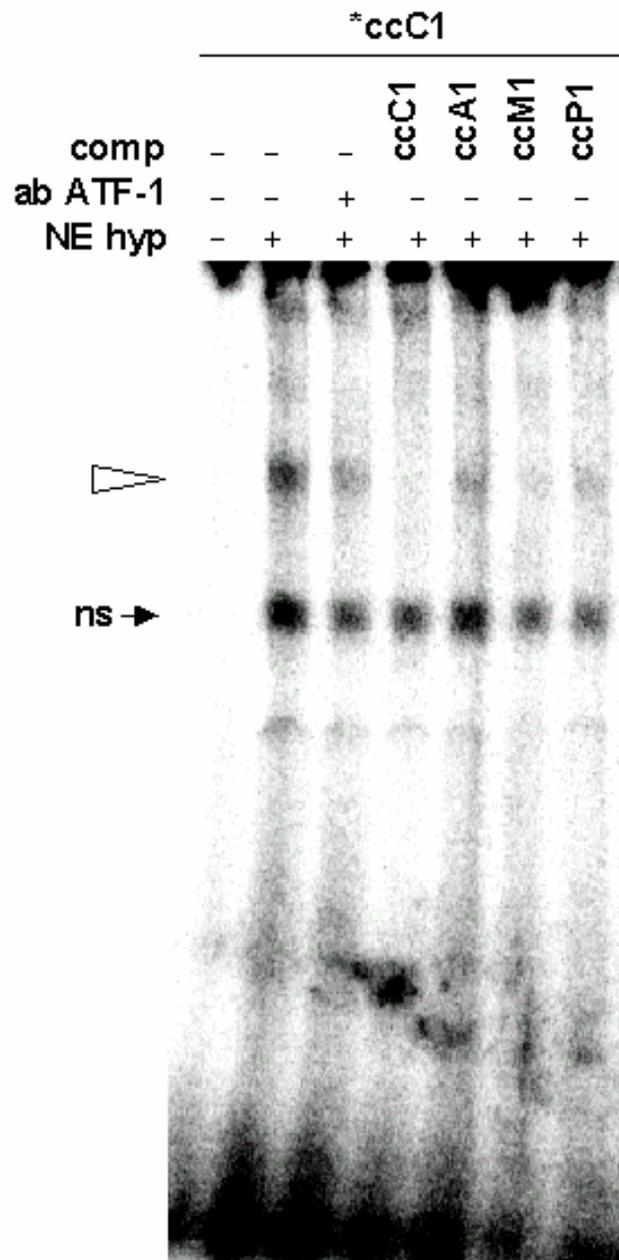


**Fig.11: Análisis del sitio ccP3 con factores de la glándula pituitaria de carpa por EMSA.**

NEhyp: extracto nuclear de hipófisis de carpa; Sitio control P2: sitio canónico de unión de Pit1;

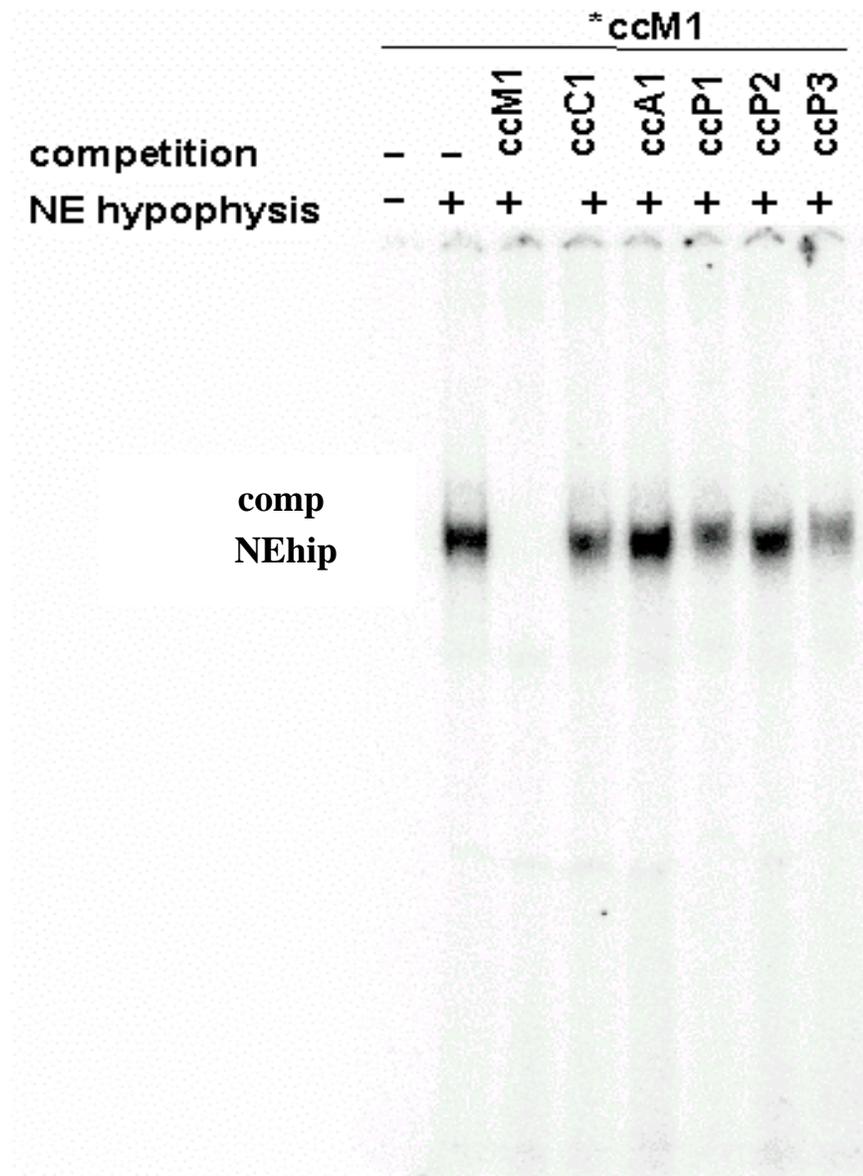
abPit1: anticuerpo contra Pit1 humano; comp: competencia con exceso de sitios no marcados; ns:

no-específica, triángulo: interacción específica.

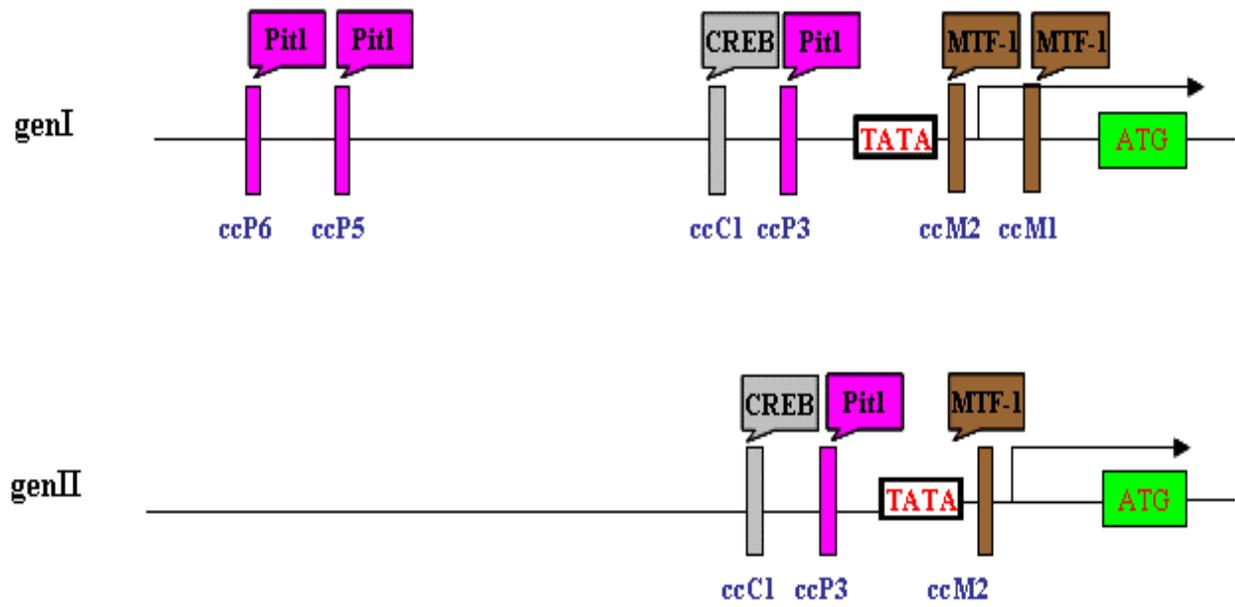


**Fig.12: Análisis del sitio ccC1 con factores de la glándula pituitaria de carpa por EMSA.**

NEhyp: extracto nuclear de hipófisis de carpa. Sitio control P2: sitio canónico de unión de Pit1; ab ATF-1: anticuerpo contra CREB; comp: competición con exceso de sitios no marcados; ns: no-específica, triángulo: interacción específica.



**Fig.13: Análisis de posibles sitios de unión del factor de transcripción MTF1 específico en el gen-I.** Análisis EMSA con el posible sitio de unión de MTF1 ccM1 presente solamente en gen-I con extracto nuclear de hipófisis de carpa (NEhyp). Sitio control P2: sitio canónico de unión de Pit1; comp: exceso de sitios no marcados; ns: no-específica, triángulo: interacción específica.



**Fig.14: Esquema de elementos cis-regulatorios en los genes I y II de Pit1 de carpa.** ATG: codon de inicio de la traducción; TATA: caja TATA; letras azules: sitios que mostraron unión con factores de transcripción; flecha: inicio de la transcripción (tss).

#### 4.4 Diseño y preparación de anticuerpo anti-carp-Pit1

En el alineamiento de las secuencia aminoacídicas deducidas de Pit1 de carpa con las secuencias aminoacídicas de otros teleósteos y mamíferos se destacó la diferencia de tamaño de la proteína derivada de 291 aminoácidos en ratón y humano, mientras en peces los aminoácidos alcanzan 351 (pez cebra), 358 (trucha y salmón), y 355 (carpa) (Fig.15). Esta diferencia de aproximadamente 60 aminoácidos más que poseen los teleósteos y que no poseen los mamíferos está reflejada principalmente por dos regiones claramente distinguibles en teleósteos, la región  $\beta$ -inserto que contiene 26 residuos de aminoácidos y la región  $\gamma$ -inserto con 33 residuos, ambas con identidad de aminoácidos cercana a 90% entre teleósteos. Las regiones  $\beta$  y  $\gamma$  también se encuentran en la proteína Pit1 derivada de pavo y con respecto a la carpa poseen una identidad cercana a 50% y 70%, respectivamente. De los dominios conservados de unión al DNA, el dominio POU<sub>s</sub> presentó una alta identidad de sobre 90% entre mamíferos, aves y teleósteos con respecto a carpa al igual que los más que 90% idénticos entre aves y teleósteos en la región POU<sub>h</sub>. En cambio, para el dominio POU<sub>h</sub>, la cantidad de residuos de aminoácidos idénticos entre mamíferos y las otras especies es de 85%. Por otra parte, la región NH<sub>3</sub> terminal de las secuencias de aminoácidos deducidas de mamíferos, aves y peces es rica en residuos de serina y cisteína lo que se corresponde con lo descrito en la literatura. Para la generación de un anticuerpo anti-Pit1 de carpa, la secuencia aminoacídica derivada de Pit1 de carpa fue usada para realizar un perfil de hidrofiliidad a través del método Doolittle (Fig.16). El perfil de los 355 residuos de aminoácidos de Pit1 de carpa mostró claramente dos extensas regiones de alta hidrofiliidad que corresponden a los dominios POU<sub>s</sub> y POU<sub>h</sub>. El oligopéptido seleccionado para ser usado en la generación de un anticuerpo, se ubicó desde el residuo de aminoácido 174 al 184, hacia el amino terminal del

dominio POU<sub>s</sub> (Fig.16). La secuencia de este oligopéptido posee más aminoácidos idénticos en mamíferos y en pez cebra (78%), que en otros teleósteos (no superior a 50%) comparado con la carpa (Fig.15). Este oligopéptido, rico en residuos de arginina y ácido glutámico, fue usado para obtener un anticuerpo cPit1 en conejo, con el cual los estudios de los sitios de unión para el factor de transcripción Pit1 se pueden ver favorecidos al caracterizar el factor de transcripción Pit1. El anticuerpo anti-cPit1 de conejo inmunorreactó con núcleos de células en cortes sagitales de hipófisis de carpa en una dilución 1:500 (Fig.17).



**Fig.15: Alineamiento de secuencias aminoacídicas derivadas de Pit1.** Secuencias aminoacídicas derivadas de las siguientes secuencias nucleotídicas.

Car: *Cyprinus carpio*, secuencia nucleotídica

GP5: *Cyprinus carpio*, secuencia nucleotídica

GP7: *Cyprinus carpio*, secuencia nucleotídica.

Zf: *Danio rerio*, pez cebra, No. Ac. gi 37222775

Spa: *Sparus aurata*, No. Ac. gi 1004293

Sal: *Salmo salar* No. Ac. gi 64378

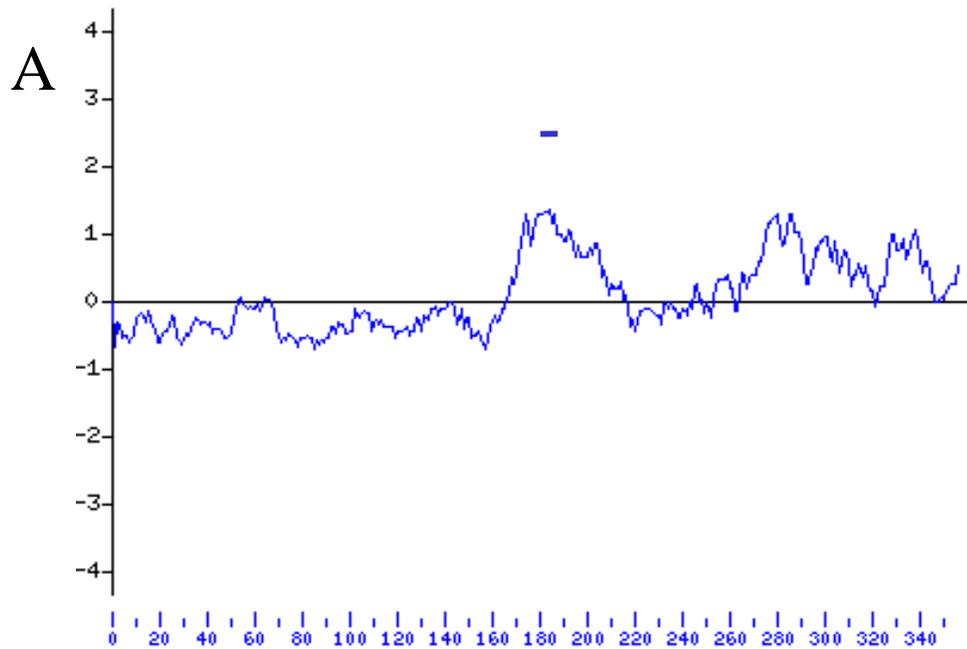
Rtr: *Oncorhynchus mikiss*, No. Ac. gi 1362668

Tur: *Meleagris gallopavo*, No. Ac. gi 64078

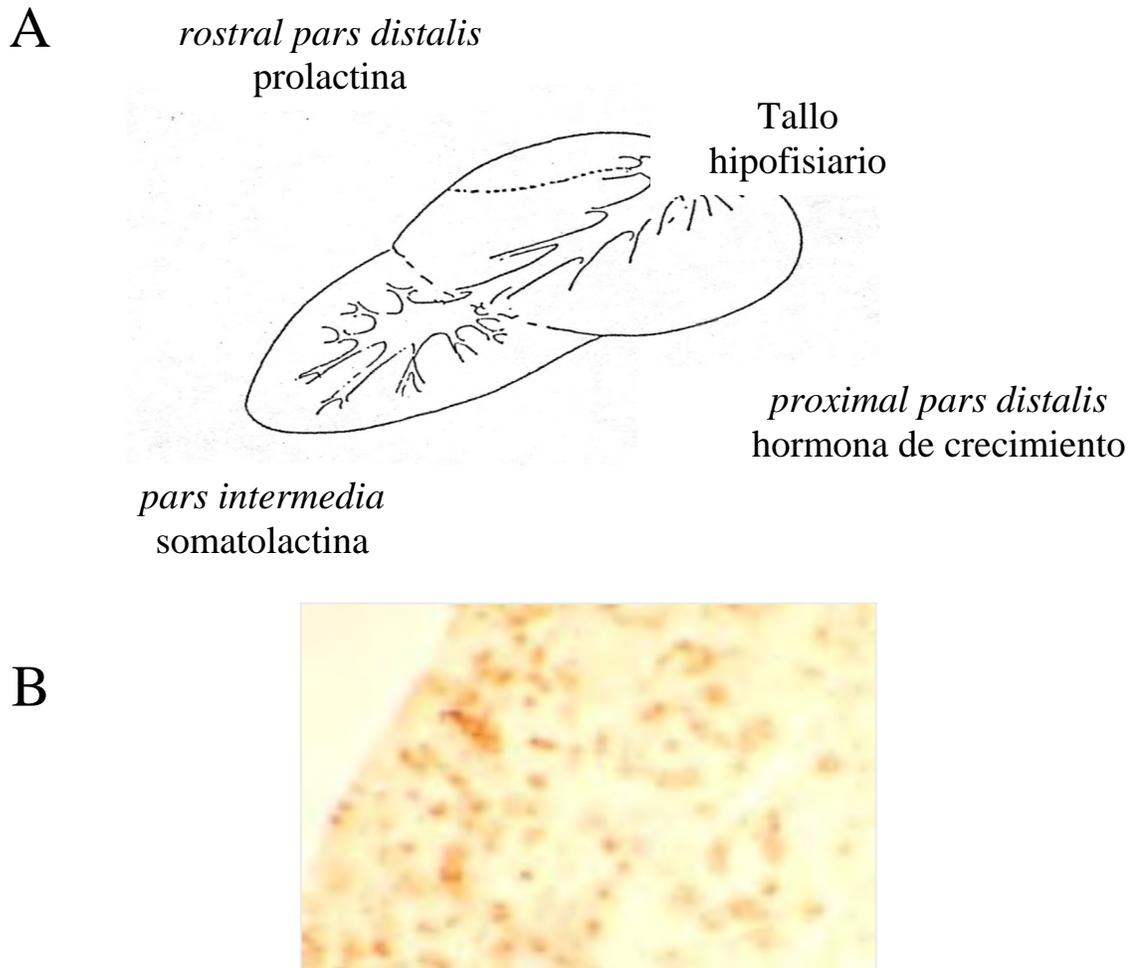
Mou: *Mus musculus*, No. Ac. gi 123409

Hum: *Homo sapiens*, No. Ac. 35475

“-“ gap; subrayado: dominio  $\beta$ -Insert,  $\gamma$ -Insert, POU-specific, y POU-homeo; se destaca en amarillo serina y en verde cisteína; en negrita: ubicación del oligopéptido sintético; triángulos: posición de intrones.



**Fig.16: Diseño y preparación de un anticuerpo anti-Pit1 de carpa.** (A) Perfil de hidrofiliidad por método Doolittle; barra indica ubicación de la secuencia del oligopéptido (B) secuencia del oligopéptido ubicado hacia el extremo amino terminal del dominio POU.



**Fig.17: Inmunodetección de Pit1 en cortes de hipófisis de carpa.** (A) Esquema de representación de diferentes regiones de la hipófisis y sus hormonas en la región *proximal pars distalis*, (B) Inmunodetección de Pit1 en núcleos de cortes sagitales de hipófisis de carpa, dilución 1:500.

## 5. DISCUSIÓN

El gen *Pit1* codifica para un factor de transcripción que juega un rol muy importante para la formación y mantención del eje hipotálamo-pituitaria y posiciona *Pit1* en el centro de una red regulatoria que es de suma importancia para el desarrollo y homeostasis en vertebrados (Dasen y Rosenfeld, 2001). El control transcripcional de la expresión de *Pit1* se ha estudiado en varias especies de mamíferos, sin embargo se sabe poco en relación a esta regulación en vertebrados más bajos en la escala evolutiva como los teleósteos (Dasen y Rosenfeld, 2001; Nica *et al.*, 2004). La comparación de las vías regulatorias entre especies cercanamente relacionadas y distantemente relacionadas aparece como un recurso poderoso para conseguir un entendimiento más profundo de los mecanismos subyacentes de la dinámica del genoma en respuesta a cambios ambientales (Elgar *et al.*, 2004; Cossins y Crawford, 2005; Venkatesh *et al.*, 2006).

El teleósteo *Cyprinus carpio*, originario de China, presente en Euroasia, África, América del Norte e introducida por el hombre en América del Sur y Australia, se encuentra distribuido en un amplio espectro de ambientes, sobrevive temperaturas entre 1°C a 35°C y se puede alimentar de dietas diversas de todos los niveles tróficos (Billard, 1999). La carpa presenta un genoma duplicado (Uyeno y Smith, 1972) y podría ser que ésto esté relacionado con la gran capacidad de adaptación a tan diferentes hábitats (Billard, 1999). La duplicación de genes y más aún la duplicación genómica juega un rol importante en la evolución proveyendo el material genético del cual pueden aparecer nuevas funciones y con eso adaptarse mejor a los cambios ambientales (Ohno, 1970). La duplicación genómica coincide con el origen de los teleósteos, de los cuales se conocen 20.000 especies extantes, grupo muy diverso en aspectos morfofuncionales y el más numeroso de los vertebrae al lado de los tetrápodos (Venkatesh *et al.*, 2006).

En los peces donde frecuentemente ocurre poliploidía, como el genoma duplicado de la carpa, carecen de un sistema de determinación de sexo por cromosomas y, se observa la influencia de factores del medio ambiente como temperatura en la determinación del sexo (Tsigenopoulos *et al.*, 2002; Mable, 2003). La confirmación del número cromosómico (Fig.4) y el análisis por Southern Blot (Kausel *et al.*, 2006) mostró claramente que hay dos genes de Pit1 y que no ocurrió una amplificación de la secuencia génica más allá de la duplicación del genoma como frecuentemente se ha observado en el genoma de plantas (Haberer *et al.*, 2004). En mamíferos la poliploidía es extremadamente improbable debido al sistema cromosómico de determinación del sexo. Un desequilibrio en el sistema de la compensación de dosis, es decir el número cromosómico en relación al número de cromosomas del sexo, implica problemas profundos como abortos espontáneos que alcanzan hasta 10% en humanos y en la mayoría de los tumores se determinó una aberración del número cromosómico, que muchas veces fue poliploidía (Comai *et al.*, 2005). El único mamífero hasta ahora descrito con un genoma duplicado es la rata viscacha, *Tympanoctomys barrerae* (Gallardo *et al.*, 1999; 2003, 2006). Este roedor vive en un hábitat muy extremo en los salares en argentina y su duplicación genómica, unos 7 millones de años atrás, coincide con una reorganización geográfica que causó la formación de este ambiente extremo (Gallardo *et al.*, 1999; 2003).

Para los estudios de las secuencias regulatorias, que se caracterizan por ser mucho menos conservadas que las secuencias codificantes de las regiones traducidas en secuencias aminoacídicas, el estudio comparativo es especialmente informativo (Bejerano *et al.*, 2004; De la Calle-Mustienes *et al.*, 2005; Venkatesh *et al.*, 2006). Elementos cis-regulatorios como las secuencias de reconocimiento de factores de transcripción, en general tampoco son muy conservados, pero sí

las secuencias de consenso de corto tamaño entre 6 a 8pb, las cuales desafían la capacidad de ser revelados *in silico* por los programas TESS y MatInspector (Salazar, 2003).

Recientemente, con el conocimiento de la secuencia de genomas completos de diversos eucariontes, los análisis comparativos revelaron en las regiones no-codificantes elementos de entre 50 y 200pb, hasta 1000pb, de largo y altamente conservados entre especies distantes como humano y pez cebra (Sandelin *et al.*, 2004; Venkatesh *et al.*, 2006). Los elementos no-codificantes altamente conservados (*conserved non-coding elements* CNE) no se encuentran distribuidos al azar homogéneamente en el genoma, sino que claramente en clusters cerca de genes que codifican factores de transcripción, como por ejemplo factores de la familia POU, lo que sugiere unos mecanismos de regulación todavía no sospechados de estos genes maestros (De la Calle-Mustienes *et al.*, 2006; Allende *et al.*, 2006; Venkatesh *et al.*, 2006). Del mismo modo, al analizar secuencias de regiones no-codificantes de genes duplicados en el mismo genoma, permite extraer información sobre la evolución de secuencias no-codificantes y la posible regulación de la expresión de genes duplicados que podría revelar mecanismos de la plasticidad y regulación de genomas en respuesta a cambios ambientales o en patologías (Rosenfeld *et al.*, 2006). Así se observó en la región promotora de los genes duplicados y transcritos de Pit1 de carpa, un cambio de módulos de elementos regulatorios y otros elementos plenamente conservados que podrían estar relacionados con su función en el control de la expresión (Kausel *et al.*, 2006).

En el caso del pez *Cyprinus carpio*, al compararse las secuencias de los promotores de los dos genes activos de Pit1, se analizaron en detalle los elementos proximales al ATG, inicio de traducción, y en especial la región río abajo de la caja TATA es de particular interés. De hecho, la secuencia alrededor de la caja TATA es altamente conservada hasta la posición +40. Solamente

tres nucleótidos difieren en este bloque de secuencias homólogas, y se agrupan precisamente alrededor del sitio de inicio de transcripción (*transcription start site*, tss) del gen-I, como se ha determinado por extensión de partidor (Kausel *et al.*, 2006). La posición de estos nucleótidos divergentes, en medio de un dominio altamente conservado, presta gran apoyo a su relevancia funcional (Fairley *et al.*, 2002). Nuestra observación sugiere que estos cambios son responsables para el desplazamiento río abajo del sitio de inicio de transcripción observado en el gen-II. Interesantemente, estos nucleótidos además son parte de una repetición invertida de 5bp en el gen-I que esta interrumpida en el gen-II. El tss de Pit1, en el gen-II esta localizado 38bp río abajo de su caja TATA, una distancia inusual, pero no imposible (Carey y Smale, 1999). La existencia de tal mRNA está apoyada por el hecho que los dos genes están claramente expresados y por la señal adicional observada en los experimentos de extensión de partidor (Kausel *et al.*, 2006). Posiblemente, la elección de esta posición inusual para el sitio de inicio de la transcripción resulta de la destrucción de un sitio tss más canónico río arriba. Sorprendentemente, el sitio tss determinado por el gen-II es nuevamente parte de una repetición de 4pb presente sólo en el gen-II. Este módulo cis-regulatorio especial, solamente se destacó a propósito de la comparación del tss de los genes duplicados. Si es que esta secuencia particular del tss o esta característica particular es funcional en la definición del tss permanece aún desconocida. Otra diferencia se encontró en un elemento repetitivo en el gen-II y solamente presente en una copia en el gen-I. Todas estas observaciones apuntan a esta región que rodea al tss como un posible candidato para la regulación diferencial de los dos genes de Pit1 expresados en carpa.

La mantención de dominios conservados presentes en la región 5' de los genes I y II de Pit1 podría ser atribuible por un lado al reciente evento de duplicación del genoma y por lo tanto, corto tiempo de divergencia (David *et al.*, 2003). Al comparar las secuencias promotoras de los

dos genes Pit1 aparecieron largas regiones de elevada conservación separadas por otras regiones de gran divergencia. Una inserción de 379pb fue identificada en el gen-II (posiciones 71-450). Dos putativos sitios de unión para Pit1 fueron revelados en esta región inserta (ccP1, ccP2), sin embargo, los experimentos de unión al DNA anteriores fallaron en detectar una clara actividad de unión a estos sitios de extractos de línea celular que expresa Pit1, GH3B6, derivada de un tumor de pituitaria de rata y de extractos de pituitaria de carpa (Kausel *et al.*, 2006). En contraste, en experimentos preliminares se encontraron dos sitios Pit1 específicos del gen-I (ccP5, ccP6) y un sitio presente en ambos genes (ccP3), que fueron capaces de unir Pit1 de extractos de GH3B6 (Fig.10). Además, el sitio ccP3 fue capaz de unir Pit1 de extractos de pituitaria de carpa (Fig.11). Este sitio presente en ambos genes, probablemente no está implicado en la regulación diferencial de los dos genes Pit1, sino que en la regulación de la expresión basal de la proteína Pit1 de acuerdo al sitio de unión Pit1 proximal en el gen Pit1 de rata (Chen *et al.*, 1990). En suma, estas observaciones son consistentes con el ciclo autoregulatorio descrito para el control transcripcional de Pit1 (Chen *et al.*, 1990; Rhodes *et al.*, 1993; Delhase *et al.*, 1996; Rajas *et al.*, 1998; Sekkali *et al.*, 1999).

En la región regulatoria de otros genes blancos de Pit1, como por ejemplo en el promotor de GH, también se encuentran varios sitios de unión para Pit1 (Sekkali *et al.*, 1999). De todos los sitios posibles de unión para Pit1, sólo algunos de estos sitios son necesarios para la activación del promotor de los genes blanco que regula (Astola *et al.*, 2003, 2004). El análisis de cinco posibles sitios de unión para Pit1 en la región regulatoria del gen SL se ha mostrado en experimentos de cotransfección con un vector de expresión de Pit1 en células CHO que es necesario un solo sitio Pit1 para la activación del gen SL de besugo (Astola *et al.*, 2004). Asimismo, también en la secuencia promotora proximal del promotor de PRL de besugo, se han

descrito hasta siete secuencias de consenso (A/T) NNNCAT para la unión del factor específico de pituitaria Pit1 de los cuales hay tres regiones funcionales (Astola *et al.*, 2003). Estos datos refuerzan nuestro análisis, en el cual determinamos tres sitios funcionales de seis posibles sitios de unión de Pit1. La presencia exclusiva en el gen-I de los sitios ccP5 y ccP6 sugiere que podrían regular diferencialmente la expresión del gen-I con respecto al gen-II.

Por otra parte, una clara actividad de unión fue detectada en otros putativos sitios de unión de factores nucleares. La secuencia conservada CRE parece unir un factor identificado como CREB/ATF-1 usando un anticuerpo específico en los ensayos EMSA con extracto de pituitaria de carpa (Fig.12). Esto concuerda con la descripción de sitios CRE funcionales en la región promotora de Pit1 de rata (Chen *et al.*, 1990). Para la regulación del gen tiGH se ha mostrado que la estimulación por cAMP del promotor de tiGH en células GC necesita el sitio de unión para CREB en la región proximal del promotor (Sekkali *et al.*, 1999). Esto demuestra la importancia de los sitios de reconocimiento para CREB en la regulación de genes blancos y del mismo gen Pit1 y corrobora que el elemento CRE caracterizado en el promotor de Pit1 de carpa podría ser funcional (Sekkali *et al.*, 1999).

No se confirmó interacción específica en el sitio posible de unión para AP1 ccA1, lo que sugiere que esta secuencia de consenso no es funcional. Sin embargo, podría ser que la otra secuencia, la ccA2 identificada recientemente, si sea funcional. Se necesitan más estudios para comprobar la relevancia funcional de este sitio. De todas maneras se espera un sitio funcional de AP1, porque en humano se ha mostrado la interacción de AP1 y Pit1 en el promotor del gen Pit1 y que AP1 esta involucrado en la regulación de la expresión en ensayos funcionales del promotor frente a un gen reportero (Delhase *et al.*, 1996). Por otra parte, también se ha demostrado en

humanos la funcionalidad del factor de transcripción AP-1 al activar el promotor del gen de PRL (Caccavelli *et al.*, 1998).

La región río abajo de la caja TATA es de particular interés ya que contiene un sitio de respuesta a un factor de transcripción no descrito antes para la regulación del gen Pit1 (Rhodes *et al.*, 1993; Delhase *et al.*, 1996; Sekkali *et al.*, 1999). La región altamente conservada inmediatamente río abajo presenta un putativo sitio de unión para MTF-1 (ccM2) en ambos genes de Pit1, mientras que la región altamente divergente más río abajo contiene un sitio MTF-1 específicamente en el gen-I (ccM1). Los complejos formados en estos dos sitios con extracto nuclear de línea celular GH3B6 fueron claramente diferentes (Kausel *et al.*, 2006). Además, el sitio ccM1 presente sólo en el gen-I de Pit1 en la posición 697-703 también fue claramente capaz de unir un factor específico similar de extractos de pituitaria de carpa (Fig.13). Bajo las mismas condiciones del ensayo de EMSA los complejos en el sitio ccM1 aparecieron más rápido y con mayor intensidad respecto a la interacción en el sitio ccP3 y sugieren una alta afinidad de un factor o factores del extracto nuclear de pituitaria en esta secuencia de reconocimiento específica del gen-I (Kausel *et al.*, 2006). La secuencia ccM1 es idéntica a los MREs descritos en múltiples módulos en el promotor del gen metalotioneina (MT) de carpa y el factor que se une podría, por lo tanto, ser el MTF-1 (Chan *et al.*, 2003). Las regiones promotoras de los genes de metalotioneina contienen los llamados Elementos de Respuesta a Metales (*Metal-responsive Element, MRE*) (Schaffner *et al.*, 2001). En el año 1988 se describió por primera vez un factor unido a una secuencia MRE en el promotor del gen-I de MT de ratón que fue llamado MTF-1 (*Metal-responsive element-binding transcription factor 1*) (Westin *et al.*, 1988). El factor de transcripción MTF-1 con dominios del tipo dedo de zinc (Schaffner *et al.*, 2001; Potter *et al.*, 2005; Westin *et al.*, 1988), un factor que se activa por exposición a metales pesados (Schaffner *et*

*al.*, 2001; van Campenhout *et al.*, 2004), estrés oxidativo (Gunes *et al.*, 1998) e hipoxia (Green *et al.*, 2001), está descrito en humanos (Brugnera *et al.*, 1994; Otsuka *et al.*, 1994) y otros mamíferos (Giedroc *et al.*, 2001; Balamurugan *et al.*, 2004), *Drosophila melanogaster* (Zhang *et al.*, 2001; Balamurugan *et al.*, 2004), *Takifugu rubripes* (Auf der Mauer *et al.*, 1999) y pez cebra (Dalton *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2007). Los elementos de reconocimiento MRE son altamente conservados y existen en genes involucrados en la detoxificación de metales pesados como el gen metalotioneina y otros genes involucrados en respuesta a estrés (Lichtlen y Schaffner, 2001; Lichtlen *et al.*, 2001; Giedroc *et al.*, 2001). La transcripción de MTs en carpa, mediada por MTF1, se estimula por Zn, Cd y Cu (Lichtlen y Schaffner, 2001; van Campenhout *et al.*, 2004). En carpa cruciana (*Carassius cuvieri*) se han descrito recientemente 9 MREs en la región regulatoria 5' en no más de 1000pb desde el codon de inicio de la traducción ATG del gen MT y que están agrupados en dos clusters, distal y proximal, de los cuales este último solamente permite la expresión del gen-I de MT por sobre el nivel de expresión basal (He *et al.*, 2007).

En búsqueda de una posible secuencia MRE en otros genes Pit1 se rastrearon las secuencias proximales del gen Pit1 en otras especies de peces. Entre las especies más cercanas, los cDNAs de carpa grass (*Ctenopharyngodon idella*) y del pez cebra están más cercanamente relacionados al gen-I de Pit1 de carpa, mientras que las especies más distantes tales como el fugu, *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* o *Oncorhynchus keta*, se diferenciaron ampliamente de las secuencias (no mostrado). Hasta hoy no se ha descrito evidencia alguna de un segundo gen Pit1, el ortólogo del gen-II de Pit1 de carpa, en ninguna de estas especies. Según nuestro análisis, el promotor del gen-I de Pit1 ha ganado dos sitios Pit1 y un sitio adicional MTF-1 relativo al gen-II (Kausel *et al.*, 2006). El sitio ccM1 en el gen-I es una figura completamente nueva, nunca antes conectada a la regulación de la expresión del gen Pit1. En el cDNA de Pit1 de carpa grass, la

secuencia ccM1 única en el gen-I no está conservada, mientras que en el cDNA del pez cebra, el bloque completo de 36 nucleótidos específicos para el gen-I está ausente (Fig.8). Los cambios modulares de elementos cis-regulatorios entre los dos genes Pit1 de carpa descritos aquí sugieren un interruptor molecular adicional en el gen-I que podría implicar una respuesta adaptativa a cambios en condiciones ambientales, tales como la adaptación a invierno. Por lo tanto, el gen-I podría constituir un ejemplo para la especialización de un gen recientemente duplicado (Prince y Pickett, 2002). La importancia funcional de estos sitios de unión adicionales en el promotor del gen-I de Pit1 está apoyada por la observación de que este gen está expresado a 4,6-veces más altos niveles en carpas aclimatizadas a invierno, mientras que la expresión general de Pit1 está dramáticamente reducida respecto al verano (Kausel *et al.*, 1999). Aún debe ser dilucidado si los sitios Pit1 adicionales o el sitio ccM1 es responsable por esta expresión más alta del gen-I en estas condiciones.

La carpa constituye un modelo para estudiar la dinámica de genes duplicados después de la duplicación genómica (Cossins y Crawford, 2005). La diferencia entre la secuencia de dos copias de un gen podría afectar la región codificante de la proteína, y llevar a una proteína con propiedades biológicas diferentes, o en la región regulatoria del gen, llevando a modificación de la expresión espacial o temporal. Un ejemplo para esto último, importante en pituitaria de carpa, fue descrito con los genes duplicados de pro-opiomelanocortina (POMC), en los cuales los mRNAs de ambos genes son expresados en distinta razón dependiendo de los cambios de temperatura en el medioambiente (Arends *et al.*, 1998). Para los genes duplicados GH, ambos expresados en carpas aclimatizadas, no se observó una regulación diferencial y no están afectadas por la aclimatización estacional (Figuroa *et al.*, 2005). Los efectos de mutaciones puntuales en la región codificante que causan dramáticos efectos deletéreos presentan variados ejemplos. En

humanos se ha descrito una mutación que afecta al dominio de transactivación de Pit1, que tiene como consecuencia la sustitución de un residuo de prolina por un residuo de leucina en el codon 24 (P24L) y que esta implicado en el Síndrome de Deficiencia Combinada de Hormonas de Pituitaria (*combined pituitary hormone deficiencies, CPHD*) (Kishimoto *et al.*, 2002). Experimentos de cotransfección *in vitro* mostraron varias mutantes responsables de CPHD en humanos. Algunas de las proteínas mutantes actúan como inhibidores dominantes de la transcripción como R271W en POUh (Hashimoto *et al.*, 2003; Kishimoto *et al.*, 2003; Reynaud *et al.*, 2004), otras poseen defectos en la unión al DNA como R143Q, E174G, W193R en POU; algunas con defectos en la interacción proteína-proteína como A158P y P239S, POU y POUh, respectivamente (Reynaud *et al.*, 2004). Además, en pacientes con falla severa de crecimiento una mutación puntual en el extremo 3' de la secuencia de la primera alfa hélice del dominio POU de Pit1 genera una proteína truncada con pérdida de la mayoría de las regiones de interacción con el DNA de sus genes blanco. Estos pacientes poseen niveles indetectables de GH, TSH-subunidad  $\beta$  y PRL, además de un reducido tamaño de la glándula pituitaria (Cohen *et al.*, 2003). Por otra parte, la conservación de secuencias no codificantes podría reflejar la conservación funcional de la regulación del gen de Pit1 (Venkatesh *et al.*, 2006).

Para complementar los estudios de la interacción de factores de transcripción en la región regulatoria de Pit1 *in vivo* y de los promotores de sus genes blanco se utilizará la metodología de inmunoprecipitación de cromatina (*chromatin immune precipitation ChIP*, Orlando *et al.*, 1997). Para esto se utilizará un anticuerpo anti-Pit1 y anticuerpos específicos de otros factores de transcripción. Como primer paso se preparó un anticuerpo anti-oligopéptido cPit1, el cual inmunorreaccionó específicamente en núcleos de células de cortes sagitales de pituitaria de carpa, en las mismas regiones de la pituitaria donde se había detectado la presencia de transcritos de

Pit1 de carpa por hibridación *in situ* (Kausel *et al.*, 1999). Pit1 se ha inmunodetectado en el núcleo de las células de la glándula pituitaria de humanos (Sanno *et al.*, 1996), roedores y salmón (Sanno *et al.*, 1994) y gallina (Chowdhury *et al.*, 2003). La compartimentalización subnuclear de Pit1 ocurre en dos fases dentro del núcleo, la mayor parte es soluble en detergentes y una fracción significativa es insoluble y está unida a la matriz nuclear (Mancini *et al.*, 1999). Mutaciones en Pit1 pueden llevar a destinamiento lejos de vías relacionadas con la transcripción, y al menos en parte a vías de desplegamiento de proteínas (Mancini *et al.*, 1999).

Los factores de transcripción constituyen puntos centrales en la integración de la red de factores involucrados en las señales endógenas y exógenas de una célula, con los múltiples factores coactivadores/corepresores que participan en los procesos de modulación de la expresión génica por lo que estos factores de transcripción actúan como genes maestros (Rosenfeld *et al.*, 2006).

En este contexto, los cambios modulares de elementos cis-regulatorios en los promotores de los genes duplicados de Pit1, sugieren que se han desarrollado nuevas posibilidades de regulación de la expresión génica de este factor de suma importancia para el sistema endocrino.

Como conclusión de este trabajo, el estudio propuesto de la funcionalidad de los posibles sitios de unión de factores de transcripción en las regiones del promotor proximal de los genes duplicados Pit1 por caracterización de la interacción DNA/proteína *in vitro* en extractos de pituitaria de *Cyprinus carpio* reveló que los sitios de unión para Pit1, ccP3, ccP5 y ccP6 y para CREB, ccC1 son funcionales. Además, en la región ccM1 se une un factor nuclear de la hipófisis que podría ser MTF-1, y el sitio ccM2 parece unir otro complejo nuclear. Más aún, la presencia exclusiva en el gen-I de los sitios ccP5, ccP6 y ccM1 sugiere que podrían estar implicados en una regulación diferencial de la expresión de los dos genes Pit1. Sin embargo, se necesita más trabajo

para dilucidar si sólo algunos de estos tres sitios o los tres regulan diferencialmente la transcripción de Pit1. El rol de anticuerpos específicos para los factores de transcripción será crucial en la caracterización de estos sitios en futuros estudios. Se estudiará el efecto de metales pesados a la expresión de Pit1 mediado por el elemento cis-regulatorio ccM1 exclusivo del gen-I de Pit1 con gran afinidad por un factor nuclear, que podría ser MTF-1, para desarrollar un nuevo bioindicador de contaminación por metales pesados en el ambiente acuático de teleósteos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Allende, M.L., Manzanares, M., Tena, J.J., Feijoo, C.G., Gomez-Skarmeta, J.L. (2006). Cracking the genome's second code. Enhancer detection by combined phylogenetic footprinting and transgenic fish and frog embryos. *Methods* 39, 212-219.
- Álvarez, M., Molina, A., Quezada, C., Pinto, R., Krauskopf, M., Vera, M.I., (2004). Eurythermal fish acclimatization and nucleolar function: a review. *J. of Therm. Biol.* 29, 663-667.
- Andersen, B., Rosenfeld, M. (1994). Pit-1 determines cell types during development of the anterior pituitary gland. *J.B.C.* 269, 29335-29338.
- Arends, R.J., van der Gaag, R., Martens, G.J., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G. (1998). Differential expresión of two pro-opiomelanocortin mRNAs during temperature stress in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Endocrinol.* 159, 85-91.
- Astola, A., Calduch-Giner, J.A., Ortiz, M., Perez-Sanchez, J., Valdivia, M.M. (2004). Genomic structure and functional análisis of promoter region of somatolactin gene of sea bream (*Sparus aurata*). *Mar. Biotechnol.* 6, 411-418.
- Astola, A., Ortiz, M., calduch-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.

- Auf der Mauer, A., Belser, T., Elgar, G., Georgiev, O., Schaffner, W. (1999) The heavy metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) is not required for neural differentiation. *Biol. Chem.* 380, 175–185.
- Balamurugan, K., Egli, D., Selvaraj, A., Zhang, B., Georgiev, O., Schaffner, W. (1994). Metal responsive transcription factor (MTF-1) and heavy metal stress response in *Drosophila* and mammalian cells: a functional comparison. *J.B.C.* 385, 597-603.
- Bejerano, G., Pheasant, M., Makunin, I., Stephen, S., Kent, W.J., Mattick, J.S., Haussler, D. (2004). Ultraconserved elements in the human genome. *Science* 28, 1321-1325.
- Bodner, M., Castrillo, J.L., Theill, L.E., Deerinck, T., Ellisman, M., Karin, M. (1988). The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox containing protein. *Cell* 55, 505-518.
- Bolander, F.F. *Molecular Endocrinology*. (2004). *Elsevier Academic Press* Third Edition.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- Buckley, B.A., Owen, M.E., Hofmann, G.E. (2001). Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history. *J. Exp. Biol.* 204, 3571-3579.
- Brugnera, E., Georgiev, O., Radtke, F., Heuchel, R., Baker, E., Schaffner, W. (1994). Cloning, chromosomal mapping and characterization of the human metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res.* 22, 3167-73.
- Caccavelli, L., Manfroid, I., Martial, J.A., Muller, M. (1998). Transcription Factor AP1 is involved in basal and Okadaic acid- stimulated Activity of the Human PRL Promoter. *Mol. Endocrinol.* 12, 1215-1227.
- Carey, M., Smale, S.T. (1999). Transcriptional regulation in eukaryotes. Concepts, Strategies, and Techniques. *Cold Spring Harbor Press*, NY.
- Chan, P.C., Shiu, C.K.M., Wong, F.W.Y., Wong, J.K.Y., Lam, K.L., Chan, K.M. (2004). Common carp metallothionein-I gene: cDNA cloning, gene structure and expression studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1676, 162-171.
- Chen, R., Ingraham, H.A., Treacy, M.N., Albert, V.R., Wilson, L., Rosenfeld (1990). Autoregulation of pit-1 gene expression mediated by two cis-active promoter elements. *Nature* 346, 583-586.

- Chen, W. Y., John, J. A. C., Lin, C. H., Chang, C. Y. (2002). Molecular cloning and developmental expression of zinc finger transcription factor MTF-1 gene in zebrafish, *Danio rerio*. *Biochim Biophys. Res. Commun.* 291, 798–805.
- Chen, W.Y., John, J.A., Lin, C.H., Chang, C.Y. (2007). Expression pattern of metallothionein, MTF-1 nuclear translocation and its DNA binding activity in zebrafish (*Danio rerio*) induced by zinc and cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 110-117.
- Chowdhury, V.S., Yoshimura, Y. (2003). Immunocytochemical identification of Pit-1 Containing cells in the anterior pituitary of Hens. *J. Reproduction. and Dev.* 49, 375-379.
- Cohen, L.E., Wondisford, F.E., Radovick, S. (1996). Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 25, 523-540.
- Cohen, L.E., Zanger, K., Brue, T., Wondisford, F.E., Radovick, S. (1999). Defective retinoid acid regulation of the Pit1 gene enhancer: a novel mechanism of combined pituitary hormone deficiency. *Mol. Endo.* 13, 476-484
- Comai, L. (2005). *Nature Pub. Group* 6, 836-846
- Cossins, A.R., Crawford, D.L. (2005). Fish as models for environmental genomics. *Nature* 6, 324-340.

- Dalton, T. P., Solis, W. A., Nebert, D. W., Carvan, M. J. (2000). Characterization of the MTF-1 transcription factor from zebrafish and trout cells. *Comp. Biochem. Physiol. B* 126, 325–335
- 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.
- Dasen, J.S., Rosenfeld, M.G. (2001). Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 327-355.
- De la Calle-Mustienes, E., Feijoo, C.G., Manzanares, M., Tena, J.J., Rodríguez-Seguel, E., Leticia, A., Allende M.L., Gomez-Skarmeta, J.L. (2005). A functional survey of the enhancer activity of conserved non-coding sequences from vertebrate iroquois cluster gene deserts. *Genome Res.* 15, 1061-1072.
- 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 expresión of the human pit1/GHF1 gene. *J. Biol. Chem.* 271, 32349-32358.
- Demarco, I.A., Voss, T.C., Booker, C.F., Day, R.N. (2006). Dynamic interactions between Pit-1 and C/EBPalpha in the pituitary cell nucleus. *Mol. Cell Biol.* 26, 8087-98.

- Elgar, G. (2004). Identification and analysis of cis-regulatory elements in development using comparative genomics with the pufferfish, *Fugu rubripes*. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 15, 715-719.
- Evans, D.H. (1993). *The Physiology of Fishes*, Ed. D.H Evans, CRC Press, Boca Raton, 315-341.
- Fairley, J.A., Evans, R., Hawkes, N.A., Roberts, S.G. (2002). Core promoter dependent TFIIB conformation and a role for TFIIB conformation in transcription start selection. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6697-6705.
- Ferris, S.D., Whitt, G.S. (1977). The evolution of duplicate gene expression in the carp (*Cyprinus carpio*). *Experientia* 33, 1299-1300.
- Figueroa, 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.
- Figueroa, J., Fernández, K., Barra, V., Richards, G, 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.

- Figuroa, J., Molina, A., Alvarez, M., Villanueva, J., Reyes, A., Leon, G., Krauskopf, M. (1994). Prolactin gene expresión and changes of prolactin pituitary levels during the seasonal acclimatization of the carp. *Comp. Biochem. Physiol.* 108B, 551-560.
- Figuroa, J., Kausel, G., San Martin, R. (2000). Growth hormone expression in carp pituitary during acclimatization. *J. Physiol. London* 523P, 36S.
- Figuroa, J., Martin, R.S., Flores, C., Grothusen, H., Kausel, G. (2005). Seasonal modulation of growth hormone mRNA and protein levels in carp pituitary : evidence for two expressed genes. *J. Comp. Physiol.* 175, 185-192.
- Fukue, Y., sumida, N., Tanase, J.I., Ohyama, T. (2005). A highly distinctive mechanical property found un the majority of human promoters and its transcriptional relevante. *Nucleic Acids Res.* 33, 3821-3827.
- Futami, K., Komiya, T., Zhang, H., Okamoto, N. (2001). Differential expression of max and two types of c-myc genes in a tetraploid fish, the common carp (*Cyprinus carpio*). *Gene* 269, 113-9.
- Gallardo, M.H., Bickham, J.W, Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A., Kohler, N. (1999). Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* 401, 341

- Gallardo, M.H., Garrido, O., Bahamonde, R., Gonzalez, M. (2004). Gametogenesis and nucleotypic effects in the tetraploid red vizcacha rat, *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia, Octodontidae). *Biol. Res.* 37, 767-775.
- Gallardo, M.H., Gonzalez, C.A., Cebrian, I. (2006). Molecular cytogenetics and allotetraploidy in the red vizcacha rat, *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia, Octodontidae). *Genomics* 88, 214-221.
- Giedroc, D.P., Chen, X., Apuy, J.L. (2001). Metal Response Element (MRE)-Binding Transcription Factor-1 (MTF-1): Structure, Function, and Regulation. *Antioxi. & Redox Sign.* 3, 577-596.
- Goldspink, G. (1995). Adaptation of fish to different environmental temperature by qualitative and quantitative changes in gene expression. *J. Therm. Biol.* 20, 167-174.
- Günes, C., Heuchel, R, Georgiev, O., Müller, KH., Lichtlen, P., Schaffner, W. (1998). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator, MTF-1. *EMBO J.* 17, 2846–54.
- Green, CJ., Lichtlen, P., Huynh, NT., Yanovsky, M., Schaffner, W., Murphy, BJ. (2001). Placenta growth factor gene expression is induced by hypoxia in fibroblasts: a central role for metal transcription factor MTF-1. *Cancer Res.* 61, 2696–703.

- Haberer, G., Hindemitt, T., Meyers, B., Mayer, K.F.X. (2004). Transcriptional similarities, dissimilarities, and conservation of cis-elements in duplicated genes of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136, 3009-3022.
- Hashimoto, Y., Cisternino, M., Cohen, L.E. (2003). A novel Nonsense Mutation in the Pit1 Gene: Evidence for a Gene dosage effect. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 1241-1247.
- He, P., Xu, M., Ren, H. (2007). Cloning and functional characterization of 5' upstream region of metallothionein-I gene from crucian carp (*Carassius cuvieri*). *J. Biochem. Cell. Biol.* (pronto a imprimirse).
- Hemersz, E., Gazdag, A.P., Ali, K.S., Nemcsok, J., Abraham, M. (2002). Differential regulation of the two metallothionein genes in common carp. *Acta. Biol. Hung.* 53, 343-350.
- Herr, W., Cleary, M.A. (1995). The POU domain versatility in transcriptional regulation by a flexible two in one DNA-binding domain. *Genes Dev.* 9, 1679-1693.
- Hoegg, S., Meyer, A. (2005). Hox clusters as models for vertebrate genome evolution. *TIGS* 21, No 8.
- Ingraham, H.A., Chen, R., Mangalam, H.J., Elsholtz, H.P., Flynn, S.E., Lin, C.R., Simmons, D.M., Swanson, L., 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., 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 del Rio, A., Rosenfeld, M.G., Aggarwal, A. K. (1996). 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. *Nat. Genet.* 33 suppl. 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 Pit1. *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.

- Kausel, G., Salazar, M., Castro, L., Vera, T., Romero, A., Muller, M., Figueroa, J. (2006). Modular changes of cis- regulatory elements from two functional Pit1 genes in the duplicated genome of *Cyprinus carpio*. *J.C.B.* 99, 905-921.
- Kim, M.K., McClaskey, J.H., Bodenner, D.L., Weintraub, B.D. (1993). An AP-1 like factor and the pituitary –specific factor Pit-1 are both necessary to mediate hormonal induction of human thyrotropin  $\beta$  gene expression. *J. B.C.* 268, 23366-23375.
- Kishimoto, M., Okimura, Y., Fumoto, M., Iguchi, G., Iida, K., Kaki, H., Chihara, K. (2003). The R271W mutant form of Pit-1 does not act as a dominant inhibitor of Pit-1 action to activate the promoters of GH and prolactin genes. *Europ. J. Endocrinol.* 148, 619-625.
- Klemm, J.D., Rould, M.A., Anger, D.M., Mader, J.T. (1994). Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules. *Cell* 77, 21-32.
- Kurima, K., Weatherly, K., Sharova, L., Wong, E. (1998). Synthesis of turkey Pit-1 mRNA variants by alternative splicing and transcription initiation. *D. and Cell Biol.* 17, 93-103.
- Lin, S.C., Li, S., Drolet, D.W., Rosenfeld, M.G. (1994). Pituitary ontogeny of the snell dwarf mouse reveals Pit1 independent and Pit1 dependent origins of the thyrotrope. *Dev.* 120, 515-522.

- 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
- Majumdar, S., Irwin, D.M., Elsholtz, H.P. (1996). Selectives constraints on the activation domain of transcription factor Pit-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10256-10261.
- Mancini, M.G., Liu, B., Sharp, D., Mancini, M.A. (1999). Subnuclear partitioning and functional regulation of the Pit1 transcription factor. *J.C.B.* 72, 322-338.
- Mayr, B., Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation dependent factor CREB. *Nat. Reviews, Mol. Cell Biol.* 2, 599-609.
- Meyer, A., van de Peer, Yves. (2005). From 2R to 3R: evidence for a fish specific genome duplication (FSGD). *BioEssays* 27, 937-945.
- Min Hao Kuo and C. David Allis (1999). *In Vivo* Cross-Linking and Immunoprecipitation for Studying Dynamic Protein: DNA Associations in a Chromatin Environment. *Meth.* 19, 425-433
- Moens, L.N., van der Ven, K., van Remortel, P., del Favero, J., de Coen, W.M. (2006). Expression profiling of endocrine-disrupting compound using a customized *Cyprinus carpio* cDNA microarray. *Toxicol. Sci.* 93, 298-310.

- 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 expresión. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 295, 582-586.
- Morris, A.E., Kloss, B., McChesney, R.E., Bancroft, C., Chasin, L.A. (1992). An alternatively spliced Pit-1 isoform altered in its ability to trans-activate. *Nucleic. Acids. Res.* 20, 1355-1361.
- Nica, G., Herzog, W., Sonntag, C., Hammerschmidt, M. (2004). Zebrafish *pit1* mutants lack three pituitary cell types and develop severe dwarfism. *Mol. Endocrinol.* 18, 1196-1209
- Norris, D.O. (1997). Comparative Aspects of the hypothalamo-hypophysial system in nonmammalian vertebrates. In: Vertebrate Endocrinology. 3ra ed., *Acad. Press*, San Diego, pp167-215.
- Ojima, Y., Takai, A. (1979). Further Cytogenetical Studies on the origin of the gold fish. *Proc. Japan. Acad.* 55, Ser B
- Ohno, S. (1970). Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes. *Sem. in Cell and Dev. Biol.* 10, 517-522

- Ono, M., Mochizuki, E., Mori, Y., Aizawa, A., Harigai, T. (1995). The regulatory region and transcription factor required for the expression of rat and salmon pituitary hormone-encoding genes show cell type and species specificity. *Gene* 153, 267-271.
- Ono, M., Harigai, T., Kaneko, T., Sato, Y., Ihara, S., Kawauchi, H. (1994). Pit-1/GH factor-1 involvement in the gene expression of somatolactin. *Mol. Endocrinol.* 8, 109-115
- Olson, L.E., Tollkuhn, J., Scafoglio, C., Krones, A., Zhang, J., Ohgi, K.A., Wu, W., Taketo, M.M., Kemler, R., Grosschedl, R., Rose, D., Li, X., Rosenfeld, M.G. (2006). Homeodomain-Mediated beta-Catenin Dependent Switching Events Dictate Cell Lineage Determination. *Cell* 125, 593-605.
- Orlando, V., Strutt, H., Paro, R. (1997). Análisis of Chromatin Structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking. *A Comp. to Meth. in Enzi.* 11, 205-214.
- Otsuka, F., Iwamatsu, A., Suzuki, K., Ohsawa, M., Hamer, D. H., Koizumi, S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 23700–23707
- Pellegrini-Bouiller, I., Belicar, P., Barlier, A., Gunz, G., Charvet, J.P., Jaquet, P., Brue, T., Vialettes, B., Enjalbert, A. (1996). A new mutation of the gene encoding the transcription factor Pit-1 is responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 2790-2796.

- Pernasetti, F., Milner, R.D., al Ashwal, A.A., de Zegher, F., Chavez, V.M., Muller, M., Martial, J.A. (1998). Pro239Ser: a novel recessive mutation of the Pit1 gene in seven middle eastern children with growth hormone, prolactin, and thyrotropin deficiency. *J. Clin. Endo. Metab.* 83, 2079-2083.
- Pfaffle, R., Kim, C., Otten, B., Wit, J.M., Eiholzer, U., Heimann, G., Parks, J. (1996). Pit1: clinical aspects. *Horm. Res.* 1, 25-28.
- Potter, B. M., Feng, L.S., Parasuram, P., Matskevich, V.A., Wilson, J.A., Andrews, G.K., Laity, J.H. (2005). The six zinc fingers of metal responsive element binding transcription factor-1 form stable and quasi ordered structures with relatively small differences in zinc affinities. *J. B.C.* 280, 28529-28540.
- Prosser, C.L. (1986). *Adaptational Biology: molecules to organisms.* John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Quentien, M.H., Barlier, A., Franc, J.L., Pellegrini, I., Brue, T., Enjalbert, A. (2006). Pituitary Transcription Factors : from congenital deficiencies to gene therapy. *J. Neuroendocrinol.* 18, 633-642.
- Radovick, S., Nations, M., Du, Y., Berg, L.A., Weintraub, B.D., Wondisford, F.E. (1992). A mutation in the POU homeodomain of Pit1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science* 257, 1115-1118.

- Rajas, F., Delhase, M., de la Hoya, M., Verdood, P., Castrillo, J.L., Hooghe-Peters, E.L. (1998). Nuclear factor 1 regulates the distal silencer of the human Pit1/GHF1 gene. *Biochem. J.* 333, 77-84.
- Reynaud, R., Saveanu, A., Barlier, A., Enjalbert, A., Brue, T. (2004). Pituitary hormone deficiencias due to transcription factor gene alterations. *G. H. and IGF Res.* 14, 442-448.
- Rhodes, S.J., Chen, R., DiMattia, G.E., Scully, K.M., Kalla, K.A., Lin, S.C., Yu, V.C., Rosenfeld, M.G. (1993). A tissue-specific enhancer confers Pit-1 dependent morphogen inducibility and autoregulation on Pit1 gene. *Gen. and Dev.* 7, 913-932.
- Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., Glass, C.K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal depending programs of transcriptional response. *Gen. and Dev.* 20, 1405-1428.
- Saez, L., Goicoechea, O., Amthauer, R., Krauskopf. (1982). Behavior of RNA and protein synthesis during the acclimatization of the carp. Studies with isolated hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 72, 31-38.
- Salazar, M., Kausel, G., Castro, L., Figueroa, J. (2003). Expresión diferencial de los genes de Pit-1 del genoma duplicado de *Cyprinus carpio*. *Biol. Res.* 36, R-136.

- Salemi, S., Besson, A., Eble, A., Gallati, S., Pfaffle, R.W., Mullis, P.E. (2003). New N-terminal located mutation (Q4ter) within the Pou1F1 –gene (PIT-1) causes recessive combined pituitary hormone deficiency and variable phenotype. *Growth Horm.* 13, 264-8
- Sanno, N., Teramoto, A., Matsuno, A., Inada, K., Itoh, J., Osamura, R.Y. (1994). Clinical and immunohistochemical studies on TSH-secreting pituitary adenoma: its multihormonality and expression of Pit1. *Mod. Pathol.* 7, 893-899.
- Sanno, N., Teramoto, A., Matsuno, A., Yoshiyuki, Osamura, R.Y. (1996). Expression of human Pit-1 product in the human pituitary and pituitary adenomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 120, 73-77
- Schaffner, W., Lichtlen, P. (2001). The metal transcription factor MTF-1: biological facts and medical implications. *Swiss Med. WKLY.* 131, 647-652.
- 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, 111-123.
- Scully, K.M., Jacobson, E.M., Jepsen, K., Lunyak, V., Viadu, H., Carriere, C., Rose, D.W., Hooshmand, F., Aggarwal, A.K., Rosenfeld, M.G. (2000). Allosteric effect of Pit1 DNA sites on Long-Term Repression in cell type Specification. *Science* 290, 1127-1131.

- Takai, A., Ojima, Y. (1982). The Assignment of the Nucleolus Organizer Regions in the Chromosomes in the Carp, the Funa and their Hybrids (Cyprinidae, Pisces). *Proc. Japan Acad.* 58, Ser B
- Takai, A., Ojima, Y. (1987). Comparative studies of Karyotypes and distributions of Nucleolus Organizer Regions in Pomacentrid Fishes. *Proc. Japan Acad.* 63, Ser B.
- Tsigenopoulos, C., Rab, 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.
- Uyeno, T., Smith, G.R. (1972). Tetraploid origin of the karyotype of catostomid fishes. *Science* 175, 644-646.
- Van Campenhout, K., Infante, H.G., Adams, F., Blusa, R. (2004). Induction and binding of Cd, Cu and Zn to Metallothionein in carp (*Cyprinus carpio*) using HPLC-ICP-TOFMS. *Toxicol. Sci.* 80, 276-287.
- Vera, M.I., Romero, F., Figueroa, J., Amthauer, R., Leon, G., Villanueva, J., Krauskopf, M. (1993). Oral administration of insulin in winter acclimatized carp (*Cyprinus carpio*) induces hepatic ultrastructural changes. *Comp. Biochem. Physiol.* 106, 677-682.

- Venkatesh, B., Kirkness, E.F., Loh, L.H., Halpem, A.L., Lee, A.P., Johnson, J., Dandona, N., Viswanathan, L.D., Tay, A., Venter, J.C., Strausberg, R.L., Brenner, S. (2006). Ancient non coding elements conserved in the human genome. *Science* 314, 1892.
- Wegner, M., Drolet, D.W., Rosenfeld, M.G. (1993). POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5, 488-498.
- Westin, G., Schaffner, W. (1988). A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene.
- Yamamoto, K., Ojima, Y. (1973). A PHA-culture method for cells from the renal tissue of teleosts. *J. J. Gen.* 48, 235-238.
- Zhang, B., Egli, D., Georgiev, O., Schaffner, W. (2001). The *Drosophila* Homolog of Mammalian Zinc Finger Factor MTF-1 Activates Transcription in Response to Heavy Metals. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4505–4514.